XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO GIỐNG LÚA TBR225 THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobaterium tumefaciens*

Phạm Thu Hằng[1], Trần Lan Đài[2], Nguyễn Văn Cửu[1],
Phạm Thị Vân[1], Đỗ Thị Hạnh[3], Phạm Xuân Hội[1], Nguyễn Duy Phương[1*]

TÓM TẮT

Lúa TBR225 là một trong những giống lúa chủ lực được trồng rất phổ biến ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tuy nhiên, giống lúa này vẫn có những nhược điểm nhất định, như mẫn cảm với bệnh bạc lá, cần được cải tiến. Ngày nay, có rất nhiều phương pháp để cải tiến tính trạng của cây trồng, trong đó có công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9. Yếu tố quan trọng nhất quyết định sự thành công trong ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 là hoàn thiện quy trình nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen cho đối tượng cây trồng quan tâm. Trong nghiên cứu này, đã xây dựng thành công quy trình chuyển gen vào giống lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Quy trình nuôi cấy *in vitro* tối ưu cho giống lúa TBR225 có tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 84,25%, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 92% và 5,2 chồi/cụm chồi. Quy trình chuyển gen lúa TBR225 tối ưu sử dụng mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* có giá trị OD_{600nm} = 0,05 cho bước đồng nuôi cấy và chất kháng sinh Hygromycin 30 mg/L cho bước chọn lọc, môi trường tạo mô sẹo MS3 (môi trường MS bổ sung 2,5-D với nồng độ 2,5 mg/L), môi trường tái sinh TS1 (môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L + BAP 0,5 mg/L), khi được thử nghiệm chuyển gen *GFP* tỉ lệ tạo mô sẹo và tái sinh chồi lần lượt là 84,25% và 92%, hiệu suất chuyển gen đạt 21,7%. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu cải tiến tính trạng của giống lúa TBR225 bằng công nghệ gen trong tương lai.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens, chuyển gen, quy trình, lúa giống TBR225.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là đối tượng cây trồng được quan tâm nghiên cứu từ rất sớm và hướng nghiên cứu chuyển gen vào lúa đã có những thành công quan trọng từ cuối những năm 1980. Nhiều phương pháp chuyển gen lúa đã được phát triển như sử dụng dòng điện và PEG [16], súng bắn gen [6] và thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* [7]. Tuy nhiên, vấn đề chuyển gen vào các giống lúa *indica* vẫn là một thách thức lớn với các nhà nghiên cứu. Hiei và Komari (2008) đã phát triển phương pháp chuyển gen vào phôi non lúa *indica* với hiệu suất khá cao. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này đó là khó chủ động nguồn mẫu do phải phụ thuộc vào mùa vụ [10]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu xây dựng môi trường nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen cho một số giống lúa *indica* Việt Nam cũng đã được thực hiện bởi các nhóm nghiên cứu của Cao Lệ Quyên và cộng sự tại Viện Di truyền nông nghiệp Việt Nam [2, 3, 4]. Các nghiên cứu này cho thấy có thể áp dụng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* đối với các giống lúa *indica*.

TBR225 là một trong những giống lúa chủ lực có diện tích canh tác chiếm tỉ trọng lớn trong sản xuất lúa ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam [17]. Tuy nhiên, giống lúa này vẫn có nhược điểm là mẫn cảm với bệnh bạc lá, dẫn đến năng suất bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Vì vậy, nghiên cứu cải tiến giống lúa TBR225 bằng các công nghệ mới là yêu cầu rất cấp thiết, giúp đảm bảo tính bền vững và hiệu quả của sản xuất lúa gạo của khu vực phía Bắc.

Do đó, trong nghiên cứu này đã xây dựng quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* làm tiền đề ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen trong chọn tạo giống lúa TBR225 trong tương lai.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống lúa TBR225 được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Tập đoàn ThaiBinh Seed. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Clontech Laboratories, Mỹ) mang vector Pcambia 1302 chứa gen *GUS* (Marker Gene Technologies, Mỹ) được

[1]Viện Di truyền Nông nghiệp
[2] Đại học Quy Nhơn
[3] Đại học Công nghiệp Hà Nội
Email: phuongnd.bio@gmail.com

cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Vì sự phát triển Pháp (IRD).

Các olionucleotide dùng để phát hiện sự có mặt của gen HFP (*Hygromycin phosphate transferase*) trong cây chuyển gen được thiết kế dựa trên trình tự đã công bố trên GenBank và đặt mua từ Hãng Invitrogen (Mỹ).

2.2. Phương pháp

Quy trình chuyển gen cho giống lúa TBR225 được xây dựng trên cơ sở quy trình chuyển gen của Phạm Thu Hằng và nnk. (2016).

2.2.1. Chuẩn bị nguyên liệu thực vật

Hạt lúa chắc, mẩy được bóc vỏ và khử trùng lần lượt trong ethanol 70%, 1 phút và dung dịch Javen 40% (v/v) chứa 0,05% Tween 20 trong 25 phút. Hạt lúa sau đó được rửa bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần. Hạt sau khi khử trùng được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và đặt trên các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo.

2.2.2. Tối ưu môi trường cảm ứng tạo mô sẹo

Hạt lúa khử trùng được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 28°C, trên các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo sử dụng môi trường nền MS (muối MS, Proline 0,5 g/L, Casein 0,5 g/L, Sucrose 30 g/L, Phytagel 3 g/L) và N6 (muối N6, Proline 0,5 g/L, Casein 0,5 g/L, Sucrose 30 g/L, Phytagel 3 g/L) được bổ sung 2,4-D ở các nồng độ: 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 mg/L. Số mô sẹo hình thành được kiểm đếm sau 5 - 7 ngày. Tỷ lệ tạo mô sẹo được tính theo công thức: (số mô sẹo tạo thành/tổng số phôi) x 100%.

2.2.3. Xác định nồng độ Hygromycin phù hợp cho chọn lọc

Hạt lúa khử trùng được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo tốt nhất, đã tối ưu ở trên (môi trường nền MS bổ sung 2,4-D 2,5 mg/L) trong điều kiện tối hoàn toàn ở 28°C. Sau 5-7 ngày, mô sẹo hình thành được loại bỏ chồi, rễ và chuyển sang môi trường cảm ứng mô sẹo mới có bổ sung chất kháng sinh Hygromycin ở các nồng độ 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L và 50 mg/L. Kết quả được ghi nhận sau 30 ngày. Tỷ lệ mô sẹo sống sót trên môi trường bổ sung kháng sinh được tính theo công thức: (tổng số mô sẹo sống sót/tổng số mô sẹo đưa vào) x 100%.

2.2.4. Tối ưu môi trường tái sinh chồi từ mô sẹo

Hạt lúa khử trùng được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo đã tối ưu (môi trường nền MS bổ sung 2,4-D 2,5 mg/L). Sau 5 - 7 ngày, mô sẹo hình thành được chuyển sang các môi trường tái sinh chồi. Môi trường tái sinh sử dụng môi trường nền MS được bổ sung BAP với nồng độ 0,5 - 1,0 - 2,0 - 2,5 mg/L. Số mô sẹo tái sinh chồi và số chồi được kiểm đếm sau 3 - 4 tuần nuôi cấy. Tỉ lệ tái sinh chồi được tính theo công thức: (số mô sẹo tái sinh chồi/tổng số mô sẹo) x 100%. Số chồi/cụm mô sẹo được tính theo công thức: (số chồi hình thành/tổng số mô sẹo tái sinh chồi) x 100%.

2.2.5. Chuyển gen vào mô sẹo lúa TBR225 thông qua A. tumefaciens

Vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp được nuôi cấy trải trên môi trường AB đặc có bổ sung kháng sinh chọn lọc Kanamycin 50 mg/L và Rifampicin 25 mg/L ở 28°C trong 2-3 ngày. Vi khuẩn được thu lại và hòa loãng trong dung dịch đồng nuôi cấy lỏng (môi trường nền N6 bổ sung *Acetosyringone* 100 µM) tới các giá trị mật độ OD_{600nm} 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1,0. Mô sẹo được lây nhiễm với dung dịch khuẩn trong 20 phút và nuôi cấy trên môi trường đồng nuôi cấy đặc (môi trường nền N6 bổ sung Agarose 10 g/L, *Acetosyringone* 100 µM). Sau 3 ngày, mô sẹo sống sót được chuyển sang môi trường chọn lọc (môi trường nền N6 bổ sung Vancomycin 200 mg/L, Cefotaxim 200 mg/L, Hygromycin 30 mg/L) trong 30 ngày. Mô sẹo sống sót tiếp tục được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường tiền tái sinh (môi trường nền MS bổ sung NAA 1,0 mg/L, Hygromycin 30 mg/L) trong 1 tuần. Sau đó, các mô sẹo được chuyển sang môi trường tái sinh (môi trường nền MS bổ sung NAA 1,0 mg/L, Kinetin 2,0 mg/L, BAP 0,5 mg/L, Hygromycin 30 mg/L) và nuôi cấy trong 3-4 tuần.

2.2.6. Phân tích cây chuyển gen

Sự biểu hiện tạm thời của gen chuyển *GFP* trong mô sẹo được xác định thông qua phương pháp soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

ADN tổng số được tách theo phương pháp CTAB của Xin *et al.* (2005) với một số cải tiến. Sự có mặt của cấu trúc T-DNA trong cây chuyển gen được xác định bằng PCR (Sambrook, Russel, 2001) với cặp mồi HPT-Fw (5'AAACTGTGATGGACGACACCGT-3'OH) và HPT-Rv (5'-

GTGGCGATCCTGCAAGCTCC-3'OH) đặc hiệu cho gen *Hygromycin phosphate transferase* (*HPT*).

2.2.7. Phân tích thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2010 và IRRISTAT4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của 2,4-D đến quá trình cảm ứng tạo mô sẹo lúa TBR225

Khả năng cảm ứng tạo mô sẹo của giống lúa bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và bản chất di truyền. Các giống lúa khác nhau có môi trường tối ưu để cảm ứng tạo mô sẹo khác nhau [2, 3, 4, 5, 14]. Trong thí nghiệm này, tiến hành khảo sát khả năng tạo mô sẹo trên hai môi trường nền MS và N6 với nồng độ 2,4-D khác nhau.

Kết quả khảo sát cho thấy mô sẹo được hình thành từ phôi trưởng thành của giống lúa TBR225 trên cả 8 loại môi trường nuôi cấy, với tỉ lệ đạt từ 33,25% – 84,25% (Bảng 1). Nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mô sẹo của lúa TBR225. Sự thay đổi tỉ lệ tạo mô sẹo giữa hai môi trường nền MS và N6 khá tương đồng. Cụ thể, môi trường chứa 2,4-D 1,5 mg/L có tỉ lệ tạo mô sẹo thấp nhất (47,50% đối với MS và 33,25% đối với N6). Tỉ lệ tạo mô sẹo tăng dần, đạt cao nhất ở môi trường chứa 2,4-D 2,5 mg/L (83,50% đối với MS và 84,25% đối với N6) và giảm khi nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy là 3 mg/L.

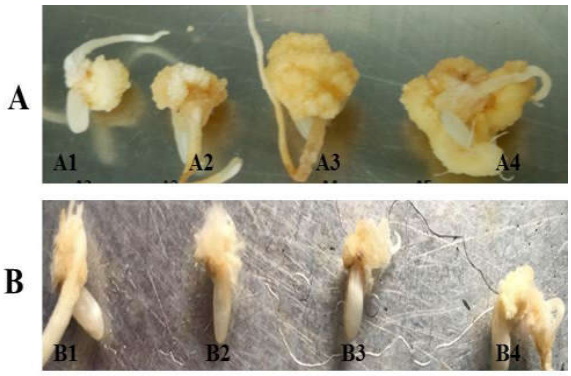
Bảng 1. Tỷ lệ tạo mô sẹo trên các môi trường khảo sát của giống lúa TBR225

Môi trường	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Môi trường	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)
MS1	47,50 ± 1,50	N6-1	33,25 ± 2,25
MS2	63,25 ± 2,25	N6-2	60,25 ± 4,75
MS3	87,25 ± 3,75	N6-3	83,50 ± 2,75
MS4	76,25 ± 1,75	N6-4	73,50 ± 4,50

Về hình thái mô sẹo, kết quả sau 5 ngày nuôi cấy trên hai môi trường nền MS và N6 cho thấy sự khác biệt rất rõ rệt. Trong khi mô sẹo hình thành trên môi trường N6 có kích thước nhỏ (0,5 - 1,5 mm), màu trắng ngà, hơi ướt, xốp, dễ vỡ, vô định hình (thường không phù hợp với thí nghiệm chuyển gen qua A. tumefaciens), mô sẹo được hình thành trên môi trường MS có kích thước lớn hơn (1,0 – 3,0 mm), màu vàng nhạt, khô, chắc, hình cầu, phù hợp với thí nghiệm chuyển gen (Hình 1).

Như vậy, xét về hình thái và tỷ lệ mô sẹo hình thành thì công thức MS3 (môi trường nền MS bổ sung 2,5 mg/L 2,4-D) là phù hợp nhất cho việc nuôi cấy mô sẹo từ phôi trưởng thành của giống lúa TBR225 phục vụ thí nghiệm chuyển gen.

Những nghiên cứu trước đây cho thấy nồng độ 2,4-D tối ưu cho việc tạo mô sẹo từ phôi trưởng thành của các giống lúa là rất khác nhau. Điều này chứng tỏ khả năng tạo mô sẹo của một giống phụ thuộc rất lớn vào bản chất giống đó và môi trường phù hợp cho từng giống lúa. Theo quy trình của Hiei et al. (2008), môi trường có nồng độ 2,4-D 2,0 mg/L có tỷ lệ tạo mô sẹo 86,52%; quy trình của Sahoo et al. (2011) sử dụng 2,4-D 3,0 mg/L cho tỷ lệ tạo mô sẹo là 84,72%; quy trình tạo mô sẹo trên giống lúa Bắc thơm 7 của Cao Lệ Quyên và nnk. (2019) có tỉ lệ mô sẹo hình thành đạt 88,75% với nồng độ 2,4-D 2,5 mg/L [5, 10, 15]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ tạo mô sẹo của giống lúa TBR225 là 87,25% trên môi trường có 2,4-D 2,5 mg/L; đây là tỉ lệ khá cao so với các quy trình tạo mô sẹo trên giống lúa indica đã công bố.



Hình 1. Hình thái mô sẹo phân hóa từ phôi trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo

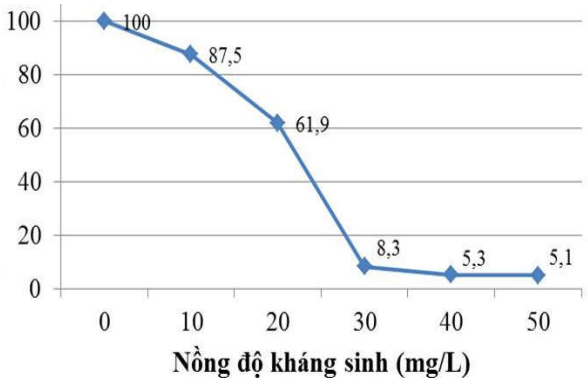
Ghi chú: A. Hạt lúa TBR225 được nuôi cấy trên môi trường MS (A) và N6 (B) có bổ sung 2,4-D với nồng độ 1,5 mg/L (1), 2,0 mg/L (2),2,5 mg/L (3) và 3,0 mg/L (4).

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của chất kháng sinh Hygromycin đến quá trình phát triển mô sẹo lúa TBR225

Trong nghiên cứu chuyển gen lúa, nồng độ chất kháng sinh chọn lọc là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng tới hiệu quả của toàn bộ quy trình. Nồng độ chất kháng sinh không đủ sẽ giảm hiệu quả chọn lọc, trong khi nồng độ quá cao sẽ gây ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo. Thí nghiệm này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh

hưởng của chất kháng sinh Hygromycin đến sự sinh trưởng của mô sẹo lúa TBR225, từ đó lựa chọn nồng độ kháng sinh tối ưu cho quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 sau này.

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mô sẹo sống sót giảm dần từ 100% - 5,1% khi tăng dần nồng độ Hygromycin từ 0 mg/L - 50 mg/L. Điều này chứng tỏ nồng độ kháng sinh có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sống sót của mô sẹo. Đặc biệt, tại nồng độ kháng sinh 30 mg/L có hiệu suất chọn lọc mô sẹo trên 90%, tỷ lệ mô sẹo sống sót giảm mạnh (8,3%) so với nồng độ kháng sinh 10 mg/L (87,5%) và 20 mg/L (61,9%). Khi nồng độ kháng sinh Hygromycin tăng lên 40 mg/L và 50 mg/L, tỷ lệ sống sót lần lượt là 5,3% và 5,1%, không có sự sai khác nhiều so với khi sử dụng kháng sinh nồng độ 30 mg/L. Bên cạnh đó, nồng độ kháng sinh cao cũng có thể ảnh hưởng đến sự sống sót và tái sinh của mô sẹo sau này [14]. Chính vì vậy, nồng độ kháng sinh Hygromycin 30 mg/L là thích hợp nhất để chọn lọc mô sẹo của giống TBR225 trong quá trình chuyển gen.



Hình 2. Ảnh hưởng của Hygromycin đối với mô sẹo lúa TBR225

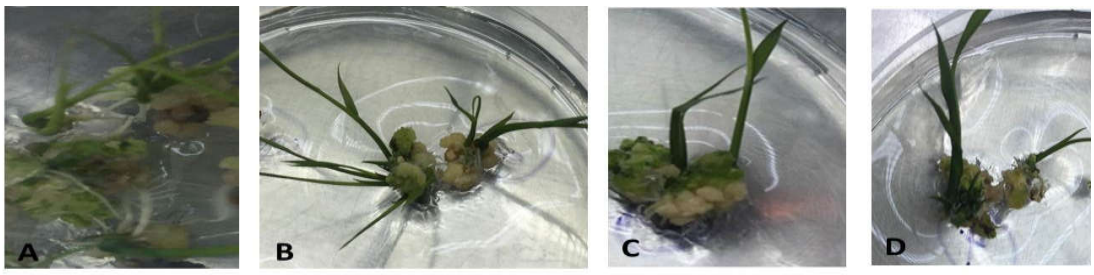
3.3. Tối ưu môi trường tái sinh chồi từ mô sẹo lúa TBR225

Hiệu quả của một quy trình chuyển gen thực vật phụ thuộc vào ba yếu tố: khả năng tái sinh của tế bào, tỉ lệ mang gen chuyển của các tế bào có thể tái sinh và hiệu quả chọn lọc các tế bào mang gen chuyển đang tái sinh [18]. Vì vậy, tối ưu môi trường tái sinh cho giống lúa TBR225 là bước rất quan trọng trong hoàn thiện quy trình chuyển gen cho một giống lúa. Trong nghiên cứu này, đã tiến hành tối ưu môi trường tái sinh cho giống lúa TBR225. Khả năng tái sinh của giống lúa TBR225 trên các môi trường khác nhau được đánh giá dựa trên số lượng chồi và số chồi/cụm mô sẹo hình thành.

Bảng 2. Tỷ lệ chồi tái sinh từ mô sẹo của giống lúa TBR225

Môi trường	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/cụm mô sẹo
TS1	92 ± 3,79	5,76 ± 0,37
TS2	78,6 ± 6,49	4,4 ± 0,40
TS3	68,6 ± 7,78	1,78 ± 0,44
TS4	59,8 ± 5,34	1,68 ± 0,40

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, mô sẹo của giống lúa TBR225 có khả năng tái sinh trên cả 4 loại môi trường khảo sát với tỷ lệ khác nhau. Cụ thể, môi trường TS1 có tỉ lệ mô sẹo tái sinh cao nhất (92%), sau đó lần lượt là các môi trường TS2 (78,6%), TS3 (68,6%) và TS4 (60,8%). Tương tự, số chồi/cụm mô sẹo hình thành trên môi trường TS1 cũng đạt cao nhất, trung bình 5,16 chồi/cụm mô sẹo. Tỉ lệ này cao gấp 3 – 4 lần so với môi trường TS3 (1,46 chồi/cụm mô sẹo) và TS4 (1,68 chồi/cụm mô sẹo). Như vậy, môi trường tái sinh TS1 (môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L + BAP 0,5 mg/L) có hiệu quả tái sinh cao nhất với hiệu suất tái sinh đạt 92%, trung bình thu được 5,16 chồi/cụm mô sẹo.



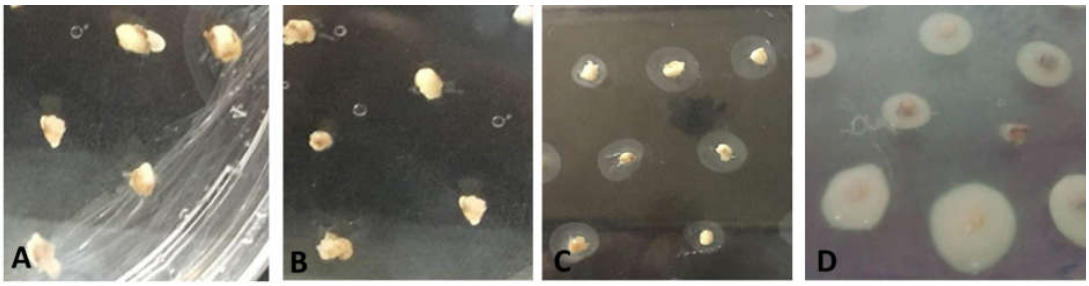
Hình 3. Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo giống lúa TBR225

Ghi chú: Cụm chồi hình thành từ mô sẹo của giống lúa TBR225 trên môi trường TS1 (A), TS2 (B), TS3 (C), TS4 (D).

Những năm gần đây, nhiều nghiên cứu khác nhau về xây dựng hệ thống tái sinh cho giống lúa *indica* đã được tiến hành. Cụ thể, theo quy trình của Sahoo và cộng sự (2011), tỷ lệ tái sinh từ mô sẹo của giống lúa IR64 đạt 84% [15]. Trong nghiên cứu của mình, Phan Thị Hương và cộng sự (2014) cũng đã tối ưu được môi trường tái sinh cho giống lúa BC15 với tỷ lệ tái sinh đạt 100%, tuy nhiên số cây/cụm mô sẹo lại rất thấp, chỉ đạt 1,33 cây/cụm mô sẹo [14]. Gần đây, Cao Lệ Quyên và nhóm nghiên cứu (2019) đã tối ưu môi trường tái sinh cho giống lúa Bắc thơm 7 với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 75% [5]. Trong nghiên cứu này, môi trường tái sinh TS1 sử dụng kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng với tỉ lệ NAA 1,0 mg/L : Kinetin 2,0 mg/L : BAP 0,5 mg/L đã đạt hiệu suất tái sinh rất cao (92%), với số chồi/cụm mô sẹo đạt 5,16.

3.4. Tối ưu hóa mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* cho lây nhiễm mô sẹo

Hiệu quả của phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn A. *tumefaciens* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như điều kiện lây nhiễm, thành phần môi trường nuôi cấy *in vitro*, mật độ vi khuẩn đồng nuôi cấy, khả năng tiếp nhận gen ngoại lai của giống lúa... [5, 10, 28]. Để tối ưu bước lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* vào mô sẹo lúa TBR225, yếu tố mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được đánh giá. Khả năng tiếp nhận DNA ngoại lai của lúa TBR225 được đánh giá thông qua sự biểu hiện của gen chỉ thị *GFP* trong mô sẹo và sự có mặt của cấu trúc chuyển gen trong cây tái sinh.



Hình 4. Mô sẹo lúa TBR225 được lây nhiễm với vi khuẩn *A. tumefaciens*

Ghi chú: Mô sẹo được lây nhiễm với dung dịch vi khuẩn A. tumefaciens mang cấu trúc pCAMBIA1302 có nồng độ OD_{600nm} lần lượt là 0,01 (A), 0,05 (B) và 0,5 (C) và 1,0 (D).

Mô sẹo lúa TBR225 được lây nhiễm với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc pCAMBIA1302 có nồng độ OD_{600nm} lần lượt từ 0,01 – 1,0. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, kết quả lây nhiễm được quan sát ghi nhận, sau đó các mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc và tái sinh để kiểm tra đánh giá khả năng tiếp nhận gen ngoại lai.

Bảng 3. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen vào mô sẹo

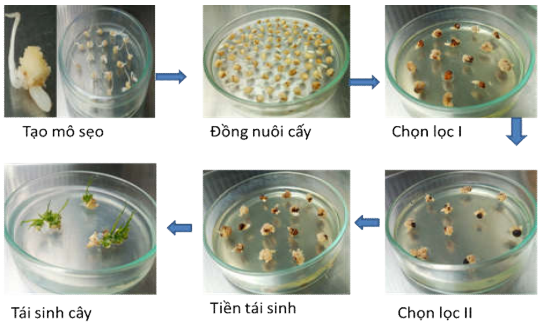
Mật độ vi khuẩn (OD_{600nm})	Mẫu nhiễm (%)		Mẫu biểu hiện *GFP* (%)
	Sau đồng nuôi cấy	Sau chọn lọc	
1,0	100 ± 0	100 ± 0	14,6 ± 2,1
0,5	94,1 ± 7,3	71,3 ± 3,4	21,3 ± 2,5
0,1	45,8 ± 1,2	24,8 ± 2,3	23,3 ± 3,1
0,05	5,8 ± 2,2	1,2 ± 1,2	43,3 ± 3,1
0,03	0 ± 0	0 ± 0	32,3 ± 3,8
0,01	0 ± 0	0 ± 0	20,3 ± 2,1

Kết quả quan sát ở bảng 3 cho thấy ở các thí nghiệm sử dụng dung dịch khuẩn *A. tumefaciens* với mật độ cao ($OD_{600nm} \geq 0,5$), vi khuẩn phát triển rất mạnh (sau 3 ngày đồng nuôi cấy), thậm chí ngay cả khi xử lý bằng 2 loại kháng sinh Cefotaxime 200 mg/L và Vancomycin 200 mg/L (giai đoạn chọn lọc) (Hình 4C&D). Tỷ lệ mô sẹo có biểu hiện gen chỉ thị *GFP* sau 2 tuần chọn lọc trong các thí nghiệm này cũng chỉ đạt lần lượt 14,6% (OD_{600nm} = 1,0) và 21,3% (OD_{600nm} = 0,5). Ngược lại, đối với thí nghiệm sử dụng dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* mật độ thấp ($OD_{600nm} \leq 0,05$), hầu như không quan sát thấy sự có mặt của vi khuẩn trên đĩa nuôi cấy sau giai đoạn đồng nuôi cấy và đặc biệt là sau giai đoạn chọn lọc I, tỷ lệ mô sẹo có biểu hiện gen chỉ thị *GFP* sau 2 tuần chọn lọc cũng không cao. Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện gen *GFP* đạt cao nhất ở thí nghiệm sử dụng dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có OD_{600nm} = 0,05 (43,3%). Đây được xác định là mật độ vi khuẩn tối ưu để thí nghiệm chuyển gen vào mô sẹo giống lúa TBR225

thông qua *A. tumefaciens* đạt hiệu suất biến nạp cao nhất.

3.5. Kết quả chuyển gen chỉ thị *GFP*

Để khẳng định sự hiệu quả của quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 đã tối ưu, thí nghiệm chuyển gen đã được lặp lại với toàn bộ các bước đã tối ưu. Sự có mặt của cấu trúc chuyển gen trong cây lúa TBR225 tái sinh được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả xác định được 79% cây lúa tái sinh có kết quả PCR dương tính với mồi đặc hiệu của gen chọn lọc *Hygromycin phosphotransferase* (*HPT*) (Hình 5)

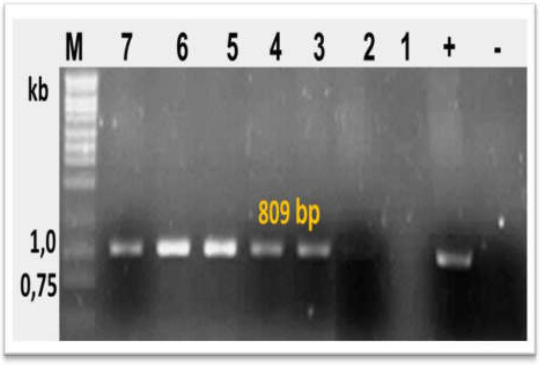


Hình 5. Chuyển gen *GFP* vào lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Bảng 4. Kết quả chuyển gen *GFP* vào lúa TBR225

Lô thí nghiệm	Tổng số mẫu	Số mẫu sống sót/phát triển/dương tính					
		Tạo mô sẹo	Đồng nuôi cấy	Chọn lọc	Tiền tái sinh	Tái sinh chồi	PCR
I	100	89	72	42	34	29	21
II	100	78	61	39	33	28	21
III	100	82	73	46	35	25	23
Trung bình	100	83,0 ± 5,5	68,7 ± 6,6	42,3 ± 3,5	34,0 ± 1,0	27,3 ± 2,1	21,7 ± 1,2

Kết quả thể hiện ở bảng 4 cho thấy, từ 100 phôi trưởng thành ban đầu, sau quá trình đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens*, chọn lọc đã thu được trung bình 27,3 chồi/cụm chồi tái sinh. Hiệu quả chọn lọc của chất kháng sinh Hygromycin đạt trung bình 79% (21,7 chồi mang cấu trúc gen chuyển/27,3 chồi tái sinh). Như vậy, hiệu suất cả quá trình chuyển gen vào lúa TBR225 đạt trung bình 21,7%.



Hình 6. Nhân bản đoạn gen *HPT* từ DNA tổng số của lúa TBR225 tái sinh

Ghi chú: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Giếng 1 - 7: mẫu DNA tổng số từ dòng lúa 2.1 đến 2.7; Giếng M: Thang DNA chuẩn 1 kb. Giếng -: đối chứng âm (khuôn DNA tổng số cây lúa TBR225 không chuyển gen).

Các nghiên cứu trước đây về chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã cho thấy tỉ lệ chuyển gen thành công vào giống lúa *indica* thấp hơn rất nhiều so với giống lúa *japonica* [7]. Trong khi hiệu suất chuyển gen của một số giống lúa *japonica* có thể đạt 52 - 100% [8], hiệu suất chuyển gen vào lúa *indica* chỉ đạt 1,78 - 13,33% [11]. Gần đây, một số quy trình cải tiến đã được công bố, hiệu quả chuyển gen vào giống lúa *indica* cũng đã có cải thiện đáng kể. Nhóm nghiêu cứu của Cao Lệ Quyên và cộng sự (2019) đã xây dựng thành công qui trình chuyển gen vào giống lúa Bắc thơm 7 với hiệu quả chuyển gen đạt 24,32% [5]. Trong nghiên cứu này, đã chuyển thành công gen *GFP* vào lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* với hiệu suất đạt 21,7%. Quy trình chuyển gen trên giống lúa TBR225 sẽ là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen trong chọn tạo giống lúa TBR225 trong tương lai.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào giống lúa TBR225. Quy trình chuyển gen lúa TBR225 tối ưu sử dụng mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* có giá trị OD_{600nm} = 0,05 cho bước đồng nuôi cấy và chất kháng sinh Hygromycin 30 mg/L cho bước chọn lọc, môi trường tạo mô sẹo MS3 (môi trường MS bổ sung 2,5-D với nồng độ 2,5 mg/L), môi trường tái sinh TS1 (môi trường MS bổ

sung NAA 1 mg/L + kinetin 2 mg/L + BAP 0,5 mg/L), khi được thử nghiệm chuyển gen *GFP* đạt hiệu suất chuyển gen 21,7%. Quy trình tối ưu đạt tỉ lệ tạo mô sẹo và tái sinh chồi lần lượt là 84,25% và 92%. Hiệu suất chuyển gen vào giống lúa TBR225 của toàn bộ quy trình đạt trung bình 21,7%. Kết quả nghiên cứu này có thể áp dụng để cải tiến các tính trạng nông sinh học quý bằng công nghệ chỉnh sửa hệ gen cho giống lúa TBR225.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blanvillain–Baufumé S., Reschke M., Solé M., Auguy F., Doucoure H., Szurek B., Meynard D., Portefaix M., Cunnac S., Guiderdoni E., Boch J., Koebnik R., 2017. Targeted promoter editing for rice resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae reveals differential activities for SWEET14–inducing TAL effectors. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3): 306–317.

2. Cao Lệ Quyên, Lê Kim Hoàn, Phạm Xuân Hội, Lê Huy Hàm, 2008. Nghiên cứu khả năng tái sinh cây lúa từ phôi của tập đoàn giống lúa Việt Nam nhằm phục vụ công tác chuyển gen. *Tạp chí Sinh học* 3: 141-147.

3. Cao Lệ Quyên, Phạm Thị Vân, Phạm Xuân Hội, 2011. Nghiên cứu khả năng tạo callus và tái sinh cây từ các giống lúa nương Việt Nam và nhập nội phục vụ cho công tác chuyển gen. *Tạp chí Sinh học* 33(1): 80-85.

4. Cao Lệ Quyên, Phạm Thu Hằng, Chu Thị Linh, Nguyễn Thị Lệ Thu, Lê Huy Hàm, Phạm Xuân Hội, 2017. Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* ở một số giống lúa chủ lực trong sản xuất ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 1/2007: 36-41.

5. Cao Lệ Quyên, Trần Tuấn Tú, Phạm Thị Vân và Phạm Xuân Hội, 2019. Xây dựng quy trình chuyển gen của giống lúa Bắc thơm số 7 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* tháng 5: 25-30.

6. Chen H., Lin Y. J., Zhang Q. F., 2009. Review and prospect of transgenic rice research. *Chinese Sci Bull* 54: 4049-4068.

7. Chen H., Lin Y. J., Zhang Q. F., 2011. Review and prospect of transgenic rice research. *Chinese Sci. Bull.,* 54(22): 4049-4068

8. Cheng X., Sardana R., Kaplan H., Altosaar I., 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of National Academy and Sciences USA* 95: 2767-2772.

9. Christou P., Ford T. L., Kofron M., 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/technology* 9: 957-962.

10. Hiei Y., Komari T., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protocols* 3: 824-834.

11. Hoa T. H. C., Bahagiawati A., Hodges T. K., 1999. Agrobacterium-Mediated Transformation of Indica Rice Cultivars Grown in Vietnam. *Omonrice 7*.

12. Li T., Liu B., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B., 2012. High–efficiency TALEN–based gene editing produces disease–resistant rice. *Nature Biotechnology* 30: 390–392.

13. Phạm Thu Hằng, Đàm Quang Hiếu, Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Xuân Hội, 2016. Thiết kế vector và chuyển gen *OsNAC1* liên quan đến tính chịu hạn vào giống lúa J02 (*Oryza sativa* L. japonica). Tạp chí Công nghệ Sinh học 14(2): 1-7.

14. Phan Thị Hương, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Tràng Hiếu và Ninh Thị Thảo, 2014. Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* trên cây lúa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* số 8(12): 1249-1257.

15. Sahoo1 K., Tripathi A., Pareek A., Sopory S., Singla-Pareek S., 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Methodology*, 7: 49.

16. Toriyama K., Hinata K., and Sasaki T. (1986). Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. *Theor. Appl. Genet.* 73: 16–19.

17. Trần Mạnh Báo, Trần Thị Hợp, Trần Thị Tiệc, Nguyễn Thị Nhung, Nguyễn Văn Hoan, 2016. Kết quả chọn tạo giống lúa TBR225. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14(9): 1360-1367

18. Tsaftaris A. S., Polidoros A. N., Karavangeli M., Nianiou-Obeidat I., Madesis P., and Goudoula C., 2000. Biological Resource Management-Connecting Science and Policy. In: *Transgenic crops: recent developments and prospects* Edited by: Balazs, E., Galante, E., Lynch J.M., Schepers J.S., Toutant J.-P., Werner D., Werry P. At\.T.J., (Eds). 187-203 Springer

19. Xin X., Shinji K, Tatsuhito F., Chuntai W., 2005. A protocol for hight-throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 23: 291-295.

A PROTOCOL FOR AGROBATERUIM–MEDIATED TRANSFORMATION INTO A TBR225 RICE VARIETY

Pham Thu Hang[1], Tran Lan Dai[2], Nguyen Van Cuu[1], Pham Thi Van[1], Do Thi Hanh[3], Pham Xuan Hoi[1], Nguyen Duy Phuong[1]

[1]*Genetic Agricultal Institue*

[2]*Quy Nhon University*

[3]*Ha Noi University of Industry*

Summary

A major rice variety, namely TBR225 has already been cultivating popularly in the Northern of Vietnam. Unfortulately, it has some disadvantages what need to be improved such as sensitivity to pets and leaf blast disease, specially. Nowadays, CRISPR/Cas9 genome editing technology emerges as the most powerful tool for improving agro-traits of crops. The prerequisite of CRISPR/Cas9 technology is an establishment of an *in vitro* culture system for the target crops. In this investigation, we have already established successful the protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation into the TBR225 rice variety. The efficiency of the optimized protocol for the TBR225 cultivar in callus induction, shoot regeneration and cluster shoot gatheres 84.25%, 92.0% and 5.2 shoot/shoot cluster, respectively. The successful applied transformed protocol into the target cultivar infected with *A. tumefaciens* at OD_{600nm} = 0.05 in the co-cultivation step; 30 mg/L Hygromycin is used for plant selection. The reporter *GFP* gene is used for testing and the efficiency of Agro-mediated transformation of the system gets a percentage of 21.7%. Our results are the premise for improving important agro-traits of TBR225 rice variety via gene technology in furture.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, transgenic, protocol, TBR225 rice variety.

Người phản biện: PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 9/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 9/8/2021

Ngày duyệt đăng: 16/8/2021