

- Vũ Công Hậu, 1996. *Trồng cây ăn quả ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội.
- Lê Lương Tế và các tác giả, 2007. *Giáo trình Bệnh cây nông nghiệp*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội
- Bùi Trang Việt, 2002. *Sinh lý thực vật đại cương, phần 1: Dinh dưỡng*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 349 tr.
- Kitagawa H., Manabe K. and Esguerra E.B, 1992. Bagging of fruit on the tree to control disease. *Acta Hort.* 321, pp 871-875.
- Valentin, U., FranciStampar, M.M., Petkovsek, D.K, 2015. The effect of fruit size and fruit colour on chemical composition in 'Kordia' sweet cherry (Prunus avium L.). *J. Food Compos. Anal.* 38, pp 121-130.

## Effects of materials used for fruit covering bags on skin colour of Banh Men and Lum red pummelo cultivars

Nguyen Huu Hai, Le Kha Tuong, Duong Thi Hong Mai, Phan Thi Nga, Tong Van Giang

### Abstract

Red pummelo cultivars Banh Men and Lum are known as traditionally valuable ones of Me Linh district, Hanoi city. However, inadequate application of advanced cultivating techniques is not synchronized, leading to low yield, low quality, less attractive fruit appearance. In order to improve the fruit appearance, the effect of bag materials on the color transformation of two red pummelo cultivars was studied during 3 years from 2016 to 2018. The results indicated that: Covering fruit of Banh Men red pummelo and Lum red pummelo with Chinese yellow and Vietnamese white bag increased brightness. The average index L of fruit skin in 3 years was 67.95 and 63.29 (Banh Men); 65.87 and 62.02 (Lum). The index a of fruit skin was -4.11 and -4.43 (Banh Men) and -3.32 and -3.89 (Lum); the index b of fruit skin was 33.69 and 30.98 (Banh Men); 35.42 and 32.77 (Lum). The yellow specially colored bag produced by Chinese companies was regarded as the best one in fruit appearance improvement and product attractiveness.

**Keywords:** Fruit appearance, fruit attractiveness, red pummelo cultivars, white nylon bag

Ngày nhận bài: 02/7/2020

Ngày phản biện: 18/7/2020

Người phản biện: TS. Cao Văn Chí

Ngày duyệt đăng: 23/7/2020

## ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN VÀO PHÔI HẠT NON GIỐNG LÚA BẮC THƠM SỐ 7 NHỜ *Agrobacterium tumefaciens*

Vũ Hoài Sâm<sup>1</sup>, Phạm Thị Vân<sup>2</sup>, Cao Lệ Quyên<sup>2</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>2</sup>, Nguyễn Duy Phương<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Giống lúa Bắc thơm số 7 là một trong những giống lúa được trồng phổ biến ở các tỉnh phía Bắc của Việt Nam, được người tiêu dùng ưa chuộng. Quy trình chuyển gen vào BT7 cần được thiết lập để có thể ứng dụng được công nghệ chỉnh sửa hệ gen nhằm cải thiện và nâng cao chất lượng giống lúa này. Callus từ phôi hạt non có khả năng tái sinh chồi tốt hơn so với phôi già. Nghiên cứu này đã xác định được các yếu tố tuổi phôi, mật độ khuẩn, nồng độ acetosyringone và thời gian đồng nuôi cấy có ảnh hưởng đến hiệu quả quá trình chuyển gen vào phôi hạt non giống BT7. Kết quả cho thấy, tuổi phôi từ 11-13 DAP đồng nuôi cấy với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có  $OD_{600nm} = 0,3$  trên môi trường có bổ sung 150  $\mu M$  acetosyringone trong thời gian 5 ngày cho hiệu suất chuyển gen đạt 20,6%.

**Từ khóa:** Bắc thơm 7, chuyển gen, phôi hạt non, *Agrobacterium*, acetosyringone

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống lúa Bắc thơm số 7 (BT7) là giống lúa ngắn ngày, năng suất và chất lượng cao. Đây là một trong những giống lúa chủ lực và được trồng phổ biến ở

các tỉnh Đồng bằng sông Hồng, miền Bắc Việt Nam. Tuy vậy, BT7 cũng là giống lúa bị ảnh hưởng nặng nề bởi nhiều loại bệnh hại, đặc biệt là bệnh bạc lá. Gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen bằng hệ thống

<sup>1</sup> Viện Dược liệu, <sup>2</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

CRISPR/CAS không ngừng được chứng minh là công cụ đắc lực cải thiện tính trạng cây trồng thông qua việc cải biến phân tử ADN mục tiêu một cách chính xác và có chủ đích (Korotkova *et al.*, 2019). Để có thể ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen cải tạo giống kháng bạc lá thì nghiên cứu xây dựng qui trình chuyển gen vào giống lúa BT7 là một trong những điều kiện tiên quyết.

Chuyển gen thông qua vi khuẩn đất *A. tumefaciens* đã được thực hiện từ những năm 1990. Phương pháp này thường được áp dụng ở lúa vì số lượng bản sao ít và ổn định, vì vậy, có đến hơn 80% các công bố chuyển gen lúa được thực hiện bằng phương pháp này (Hiei T. and Komari Y. 2008). Tuy nhiên, với rất nhiều những nỗ lực và sự phát triển của khoa học công nghệ, hiệu quả của các quy trình chuyển gen vào các giống lúa thuộc loài phụ *indica* vẫn được xem là kém hơn so với giống thuộc loài phụ *japonica*. Nhiều tác giả cho rằng, điều này phụ thuộc vào bản chất di truyền và kiểu gen của từng giống, mà yếu tố quyết định chính nằm ở khả năng hình thành mô sẹo và tái sinh cây hoàn chỉnh trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở mỗi loại giống (Sahoo *et al.*, 2011). Sử dụng phôi hạt non làm vật liệu khởi đầu cho quá trình chuyển gen đã được chứng minh là hiệu quả hơn nhiều so với các loại vật liệu khác (phôi già), do khả năng tạo mô sẹo và khả năng tái sinh cây từ vật liệu phôi hạt non tốt hơn ở lúa (Visarada *et al.*, 2002).

Trong nghiên cứu này, một số yếu tố tác động đến hiệu quả quy trình chuyển gen phôi hạt non thông qua *A. tumefaciens* đã được tiến hành nghiên cứu nhằm hoàn thiện quy trình chuyển gen phôi hạt non vào giống lúa BT7. Kết quả này là cơ sở để ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen trong chọn tạo giống ở lúa.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa Bắc thơm số 7 được cung cấp bởi công ty giống Thái Bình. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Clontech Laboratories, Mỹ) mang vector pCAMBIA1302 (Marker Gene Technologies, Mỹ) được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Vì sự phát triển Pháp (IRD).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các bước thực hiện quy trình chuyển gen vào phôi hạt non giống lúa BT7 được thực hiện dựa trên Quy trình chuyển gen phôi hạt non vào giống lúa IR64 của Slamet và cộng tác viên (Agrobacterium-Mediated transformation: Rice transformation 2014) có cải tiến.

#### 2.2.1. Chuẩn bị nguyên liệu thực vật

Giống lúa BT7 được gieo trồng trong nhà lưới An toàn sinh học của Viện Di truyền Nông nghiệp (Đường Phạm Văn Đồng, Hà Nội). Sau thụ phấn, thu hoạch và khử trùng hạt non bằng dung dịch 40% Javen trong 5 phút. Tráng lại ít nhất 5 lần bằng nước cất vô trùng.

#### 2.2.2. Chuẩn bị vi khuẩn

Trái khuẩn từ stock lên môi trường AB có bổ sung 50mg/L kanamycin và 15 mg/L rifamycin, nuôi trong tối ở 28°C trong 3 ngày. Thu khuẩn và hòa loãng bằng môi trường lỏng AA, pH 5,2 (Toriyama và Hinata, 1985) có bổ sung acetosyringone 100µM tới mức mật độ tương ứng tùy từng thí nghiệm (Slamet *et al.*, 2014).

#### 2.2.3. Phương pháp chuyển gen phôi hạt non

Tách phôi hạt non (IEs) từ hạt non vô trùng đặt lên môi trường đồng nuôi cấy (N6, 2,0 mg/L 2,4-D, 1mg/L NAA, 1mg/L BAP, pH 5,2; 8 g/L agar) có bổ sung acetosyringone (Slamet *et al.*, 2014). Nhỏ 5 µL dịch khuẩn vào mỗi IEs nuôi trong tối ở 25°C 5 ngày hoặc 7 ngày tùy thí nghiệm. Sau đó, chọn lọc callus trên môi trường (N6; 1,0 mg/L 2,4-D, 1,0 mg/L NAA, 0,2 mg/L BAP; pH 5,8; 6,5 g/L phytigel) có bổ sung cefotaxime 200 mg/L, vancomycine 100 mg/L, hygromycin 50 mg/L, nuôi trong tối 30 ngày ở 28°C. Sau mỗi 10 ngày cấy chuyển các callus sống sót sang môi trường mới. Sau 10 ngày đầu cấy nhỏ callus thành 2 phần. Kết thúc 3 lần chọn lọc, chuyển các callus trắng sáng vào môi trường tiền tái sinh (MS, 2 mg/L BAP, 0,2 mg/L NAA, 200 ml/L nước dừa, pH 5,8; 6,5 g/L phytigel) có bổ sung 100 mg/L cefotaxim và 50 mg/L hygromycin nuôi 7 ngày trong tối ở 28 °C và môi trường tái sinh (MS, 2 mg/L Kin, 0,2 mg/L NAA, 200 ml/L nước dừa, pH5,8 và 6,5 g/L phytigel) có bổ sung 30 mg hygromycin ở 25 °C±2, cường độ ánh sáng 2000 lux (Cao Lệ Quyên và *ctv.*, 2019). Chồi phát sinh từ cụm callus xanh được tách ra, cấy vào môi trường MS để tạo rễ. Tách chiết DNA tổng số của cây T0 thu được theo phương pháp CTAB (Doyle J. and Doyle L. 1990). Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR (Sambrook J. and Russel DW. 2001) với cặp mồi HPT-Fw (AAGGAGGTGATCCAGCC); HPT-Rv (GAGTTTGATCCTGGCTCAG).

#### 2.2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen phôi hạt non BT7: Thí nghiệm 2 nhân tố gồm 6 công thức, được thiết kế từ 3 mức mật độ vi khuẩn ở OD<sub>600nm</sub> là

0,1; 0,3 và 0,5 với 2 mức thời gian đồng nuôi cấy là 5 ngày và 7 ngày. Kết quả ghi nhận số callus sạch hay callus phôi hóa thu được của từng giai đoạn và hiệu quả chuyển gen được đánh giá dựa trên số cây mang gen *HPT* thu được.

Khảo sát ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu quả chuyển gen phôi hạt non BT7, gồm 3 công thức: 8 - 10 ngày sau thụ phấn (DAP); 11-13 DAP và 14 - 16 DAP. Đánh giá tỷ lệ % IEs tạo callus ở giai đoạn đồng nuôi cấy (= số IEs tạo callus/IEs lây nhiễm × 100%; tỉ lệ % callus sống sót sau giai đoạn chọn lọc (= số callus sống sót/số callus tạo thành × 100%); tỉ lệ % callus tái sinh (= số callus tái sinh (màu xanh)/ số callus sống sót × 100%); hiệu suất chuyển gen (= số cây mang gen *HPT*/số IEs lây nhiễm × 100%).

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringon trong môi trường đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen: Thí nghiệm gồm 4 mức nồng độ AS được khảo sát là 0 μM, 100 μM; 150 μM và 200 μM. Kết quả ghi nhận số IE sống sót trên môi trường đồng nuôi cấy, số callus sau quá trình chọn lọc, số callus tái sinh và số cây dương tính khi PCR mang gen *HPT*.

Bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại, mỗi nghiệm thức/lần nhắc lại được thực hiện với 60 phôi hạt non.

### 2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel và SPSS (Giá trị trong bảng được trình bày là: Mean ± SD của 3 lần lặp lại; các chữ cái nhỏ a,b,c,... biểu diễn phân hạng theo Duncan's Test, a là max và giảm dần theo thứ tự... bằng chữ cái).

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 12 năm 2019 tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của mật độ *A. tumefaciens* (OD<sub>600nm</sub>) và thời gian đồng nuôi cấy

Mật độ vi khuẩn, vật liệu thực vật và thời gian đồng nuôi cấy là những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình chuyển gen. Sự tăng sinh của vi khuẩn tỷ lệ thuận với thời gian. Để xác định được nồng độ khuẩn thích hợp để lây nhiễm phôi hạt non giống lúa BT7, nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *A.grobacterium tumefaciens* (OD<sub>600nm</sub>) và thời gian đồng nuôi cấy IEs đã được thực hiện, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của OD<sub>600nm</sub> và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào phôi hạt non giống lúa BT7

Nghiệm thức			Số phôi tạo callus	Số callus sáng sau chọn lọc 1	Số callus sáng sau chọn lọc 2	Số callus sáng sau chọn lọc 3	Số cây con	Số cây PCR dương tính mỗi <i>HPT</i>
Ký hiệu	Giá trị OD	Số ngày						
AD1	0,1	5	47,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	22,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	7,3 ± 3,1 <sup>b</sup>	-	-	
AD2	0,1	7	43,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	17,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,6 <sup>bc</sup>	0,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	-	
AD3	0,3	5	39,3 ± 1,2 <sup>c</sup>	15,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	11,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,7 <sup>a</sup>	8,3 ± 4,2	3,3 ± 1,5
AD4	0,3	7	34,3 ± 1,5 <sup>d</sup>	9,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	3,0 ± 3,5 <sup>cd</sup>	-	-	
AD5	0,5	5	24,7 ± 1,5 <sup>e</sup>	2,0 ± 1,0 <sup>d</sup>	-	-	-	
AD6	0,5	7	17,7 ± 2,5 <sup>f</sup>	-	-	-	-	

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: Giá trị OD ở bước sóng 600 nm và thời gian đồng nuôi cấy có tác động đáng kể đến hiệu quả chuyển gen phôi hạt non giống lúa BT7. Số phôi hạt non tạo callus có xu hướng giảm dần khi mật độ vi khuẩn (giá trị OD) và thời gian đồng nuôi cấy tăng. Qua theo dõi diễn biến thực tế, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ IEs nhiễm tăng dần theo thứ tự các công thức từ AD1-AD6. Quan sát trạng thái biểu hiện cho thấy, trong khi IEs có vết khuẩn

bám nhẹ ở bề mặt dưới IEs ở các công thức AD1, AD2 thì mức độ khuẩn tăng dày AD3, AD4 và dần bao trùm kín bề mặt IEs ở công thức AD5 và AD6 (Hình 1A, B). Đồng thời, ở các công thức thời gian đồng nuôi cấy 5 ngày (AD1, AD3, AD5), callus có màu vàng nhạt, trong khi ở các công thức thời gian đồng nuôi cấy 7 ngày (AD2, AD4, AD6), callus hình thành từ các IEs có biểu hiện dần bị hóa nâu đen ở bề mặt ngoài (Hình 1C).



**Hình 1.** Đồng nuôi cấy phôi hạt non (IEs) lúa giống BT7

*Ghi chú:* A: IEs trên công thức AD3 ( $OD_{600nm} = 0,3$ ; lây nhiễm trong 5 ngày); B: Khuẩn bao trùm kín bề mặt IEs; C: Bề mặt IEs nâu hóa sau 7 ngày.

Với kỹ thuật lây nhiễm phôi hạt non theo quy trình áp dụng trong nghiên cứu này, việc quản lý mức độ nhiễm là hết sức cần thiết. Phôi hạt non là loại vật liệu có sức sống kém khi gặp điều kiện bất lợi. Do vậy, khi tiếp tục theo dõi biểu hiện của các nghiệm thức ở giai đoạn chọn lọc, chúng tôi nhận thấy: theo thời gian số callus nhiễm ngày càng giảm, số callus chết ngày càng tăng. Ở lần chọn lọc đầu tiên, số lượng callus thu được khác biệt và giảm dần theo thứ tự các công thức, từ AD1→AD6. Kết thúc chọn lọc 1 không thu được callus trắng sáng ở công thức AD6. Tiếp theo đó, khi kết thúc chọn lọc 2, số lượng callus ở các công thức AD1, AD2, AD4 giảm đáng kể, đồng thời không thu được callus sáng ở công thức AD5, do đã bị chết và nhiễm hết. Số lượng callus ở công thức AD3 tuy có giảm so với chọn lọc 1 nhưng số lượng giảm không đáng kể và đây là công thức duy nhất thu được số lượng callus trắng sáng sau chọn lọc lần, đạt trung bình  $8,0 \pm 1,7$  callus từ 60 IEs ban đầu. Điện di sản phẩm PCR của DNA từ là cây con tái sinh từ công thức này cho thấy tỷ lệ cây dương tính với mỗi hph đạt khá cao ( $> 40\%$ ) và theo tính toán hiệu suất chuyển gen trung bình đạt 5,6%.

Mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* áp dụng để chuyển gen phôi hạt non ở các loài thực vật khác nhau hay các giống lúa khác nhau ở các công bố trước đây khá khác nhau, tùy thuộc vào kiểu gen và phương thức lây nhiễm. Cùng trên đối tượng phôi hạt non giống IR64, giá trị  $OD_{600nm}$  là 1,0 theo phương thức chuyển gen của Hiei và Komari (2008), lây nhiễm khuẩn trong thời gian 15 phút, rửa IEs và đồng nuôi cấy trong 7 ngày. Theo quy trình chuyển gen phôi hạt non của Slamet và cộng tác viên (2014),

mật độ khuẩn là 0,3 ở  $OD_{600nm}$  và nhỏ khuẩn vào IEs và đồng nuôi cấy trong 7 ngày được khuyến cáo (Slamet *et al.*, 2014). Tuy vậy, trong nghiên cứu này kết quả thu được ở công thức AD4 cho thấy số lượng callus giảm mạnh và đến cuối chọn lọc 3 không còn callus nào sống sót. Điều này có thể là do kích thước phôi lúa BT7 nhỏ và yếu hơn so với phôi hạt IR64.

Như vậy, đồng nuôi cấy phôi hạt non lúa giống BT7 với vi khuẩn *A. tumefaciens* mật độ  $OD_{600nm}$  là 0,3 trong thời gian 5 ngày là phù hợp, cho hiệu quả chuyển gen cao nhất, đạt 5,55%.

### 3.2. Ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu quả chuyển gen vào phôi hạt non lúa BT7

Hiệu quả quá trình chuyển T-DNA vi khuẩn vào tế bào thực vật thường bị tác động bởi tuổi mô hoặc cây, dạng tế bào, giai đoạn chu trình tế bào và các chỉ tiêu sinh lý khác nhau. Phôi có kích thước lớn có khả năng sống sót trong môi trường khuẩn *Agrobacterium* cao hơn, tuy nhiên khả năng tái sinh lại kém hơn (Ananthi and Anandakumar, 2018). Thông thường, tuổi phôi được tính từ thời điểm thụ phấn đến 30 ngày sau đó (DAP-ngày sau thụ phấn), có liên quan đến kích thước phôi và đặc điểm sinh lý sinh hóa tương ứng của phôi lúa. 10 ngày đầu (0 - 10 DAP) là giai đoạn biệt hóa cơ quan, 10 ngày tiếp theo (10 DAP - 20 DAP) là giai đoạn trưởng thành của phôi và giai đoạn 20 DAP - 30 DAP là giai đoạn ngủ nghỉ của phôi lúa (Itoh *et al.*, 2005). Để nâng cao hiệu quả của cả quá trình chuyển gen vào giống lúa BT7, nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu quả tái sinh và hiệu suất chuyển gen đã được thiết lập. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tuổi phôi hạt non đến hiệu quả chuyển gen lúa BT7

Nghiệm thức		% IEs tạo callus	% callus sau chọn lọc	% callus tái sinh	Số cây con thu được	% cây dương tính PCR mỗi hpt
Ký hiệu	DAP (ngày)					
IE 1	8 - 10	$70,1 \pm 0,9^b$	$16,3 \pm 4,0^b$	$64,2 \pm 15,1^a$	$6,7 \pm 2,5^b$	$45,8 \pm 3,8^b$
IE 2	11 - 13	$80,8 \pm 3,5^a$	$24,6 \pm 5,5^{ab}$	$56,8 \pm 8,7^a$	$14,0 \pm 2,7^a$	$59,0 \pm 4,2^a$
IE 3	14 - 16	$85,0 \pm 1,2^a$	$26,4 \pm 4,6^a$	$22,6 \pm 4,3^b$	$3,7 \pm 1,2^b$	$24,4 \pm 21,4^b$

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tuổi phôi có tác động rõ rệt đến sự tạo thành callus giai đoạn đồng nuôi cấy và số callus thu được sau quá trình chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh. Theo kết quả xử lý thống kê cho thấy, các chỉ số này ở công thức IE1 ở mức phân hạng thấp hơn hẳn so với công thức IE2 và IE3. Điều này có thể do kích thước và trọng lượng phôi những thời điểm này lớn hơn so với với phôi ở thời điểm 8-10 DAP, nên khả năng tạo callus và sức sống tốt hơn. Theo Slamet và cộng tác viên (2014), tuổi phôi hạt non thích hợp để chuyển gen phôi hạt non là 8 - 12 DAP đối với giống IR64. Thực tế, kích thước hạt và trọng lượng 1000 hạt của giống IR64 lớn hơn so với hạt giống BT7. Hơn nữa, thời gian sinh trưởng của IR64 (105 - 110 ngày) cũng ngắn hơn so với BT7 (> 115 ngày). Như vậy, rõ ràng là kích thước phôi hạt non hay thời gian DAP có tác động đến quá trình tạo callus và khả năng sống sót của chúng qua quá trình chọn lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh, DAP càng cao thì tỷ lệ tạo callus và khả năng sống sót của callus càng lớn.

Các chỉ tiêu nghiên cứu: số callus tái sinh, số cây con tạo thành và số cây mang kháng hygromycine thu được ở 3 công thức trong thí nghiệm lại có diễn biến khác. Kết quả xử lý thống kê của 3 lần lặp lại cho thấy, tỷ lệ callus có khả năng tái sinh tỷ lệ nghịch với độ lớn của DAP. Khi độ dài ngày DAP tăng (IE1→IE3) thì tỷ lệ phần trăm mẫu callus giảm dần. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu

của Visarada và cộng tác viên (2002) và Aananthi và Anandakumar (2018), kích thước phôi càng lớn thì khả năng tái sinh càng giảm.

Mặc dù, tuổi phôi sử dụng trong nghiên cứu này đều có khả năng tiếp nhận gen (% cây PCR dương tính với mỗi hygromycin đều > 24%). Nhưng số cây con tạo thành cao nhất (14 cây/lần nhắc lại) và tỉ lệ cây mang gen kháng hygromycin cao nhất (~ 60%) thu được ở nghiệm thức IE2 và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (IE1 và IE3). Giá trị Mean và SD ở công thức IE3 tương đương nhau cho thấy sự khác biệt lớn giữa các lần lặp lại. Điều này chứng tỏ tuổi phôi thích hợp nhất để chuyển gen phôi hạt non giống lúa BT7 là 11-13 DAP. Đây là giai đoạn đầu của quá trình phôi trưởng thành, hiệu suất chuyển gen đạt 13,9%.

### 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone (AS) đến hiệu quả chuyển gen vào phôi hạt non lúa BT7

Trong quá trình đồng nuôi cấy, sự có mặt của Acetosyringone với các mức nồng độ khác nhau từ 0 - 400 µM đã được sử dụng ở các công bố trước đây (Sawant *et al.*, 2018). Trong nghiên cứu này, 4 công thức nồng độ AS (0, 100, 150, 200 µM) đã được khảo sát để xác định mức nồng độ thích hợp cho tỷ lệ cây tiếp nhận gen ngoại lai qua phôi hạt non giống BT7 đạt cao nhất. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ AS đến quá trình chuyển gen vào phôi hạt non lúa BT7

Nồng độ AS (µM)	IEs/lần nhắc lại	Số callus sau đồng nuôi cấy	Số callus sau chọn lọc	Số callus tái sinh	Số cây mang gen hpt
0	60	46,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	15,7 ± 2,9 <sup>a</sup>	9,7 ± 2,2 <sup>a</sup>	-
100	60	41,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	11,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	6,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	8,3 ± 2,5 <sup>b</sup>
150	60	38,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	10,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	6,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	12,3 ± 2,2 <sup>a</sup>
200	60	26,7 ± 3,2 <sup>c</sup>	2,7 ± 2,3 <sup>c</sup>	-	-

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số callus thu được ở tất cả các giai đoạn đều có xu hướng giảm khi nồng độ AS tăng. Ở công thức môi trường có bổ sung 200 µM giảm đáng kể, số callus thu được sau mỗi giai đoạn giảm rõ rệt. Mức nồng độ này, không những gây chết nhiều mà còn làm mất khả năng tái sinh của callus. Điều này chứng minh rằng nồng độ AS cao đã gây độc đối với callus giống lúa BT7. Mặc dù, số callus tái sinh ở công thức không bổ sung AS đạt cao nhất và khác biệt so với các công thức còn lại theo phân hạng Duncan's test, nhưng không cây nào mang gen hpt (gen kháng hygromycin). Kết quả xử lý thống kê cho thấy: số liệu ghi nhận được ở tất cả các giai đoạn của 2 công thức nồng độ AS 100 µM và

150 µM khác nhau không có ý nghĩa ( $\alpha = 0,05$ ). Tuy nhiên, số cây mang gen hpt ở nghiệm thức 150 µM là 12,3 cây (hiệu suất chuyển gen đạt 20,6%) vượt trội hơn so với nghiệm thức 100 µM (8,3 cây).

Như vậy, AS 150 µM là ngưỡng nồng độ thích hợp để chuyển gen vào phôi hạt non giống lúa BT7, cho hiệu suất chuyển gen cao nhất, đạt 20,6%.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Thời gian đồng nuôi cấy và mật độ khuẩn ở bước sóng 600 nm, tuổi phôi và nồng độ acetosyringone trong môi trường nuôi cấy có tác động đáng kể đến

hiệu quả chuyển gen vào phôi hạt non giống lúa Bắc thơm số 7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả nghiên cứu này đã xác định được tuổi phôi từ 11-13 DAP đồng nuôi cấy với dung dịch vi khuẩn có  $OD_{600nm} = 0,3$  trên môi trường có bổ sung  $150 \mu M$  AS trong thời gian 5 ngày thu được hiệu suất chuyển gen cao nhất, đạt 20,56%.

#### 4.2. Đề nghị

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 BT7 và các giống lúa chủ lực khác của Việt Nam.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen để cải tạo tính trạng mùi thơm và kháng bạc lá trên một số giống lúa chủ lực của Việt Nam” (2017 - 2020), thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Thủy sản của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn!

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cao Lệ Quyên, Trần Tuấn Tú, Phạm Thị Vân và Phạm Xuân Hội, 2019. Xây dựng qui 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*, 5: 25-30.
- Aananthi N. and Anandakumar CR., 2018. Genetic transformation in Aromatic Indica rices mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Int.J.Curr.Microbiol. App.Sci*, 7 (12): 3458-3487.
- Doyle, J. and Doyle, L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

- Hiei, T. and Komari, Y., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *J. Nature Protocol*, 3 (5): 824-834.
- Itoh, JI., Nonomura, KI., Ikeda K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamagishi, H., Kitano, H. and Nagato, Y., 2005. Rice plant development: from Zygote to Spikelet. *Plant cell physiol*, 46 (1):23-47.
- Korotkova, AM., Gerasimova, SV. and Khlestkina, EK., 2019. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov J. Genet. iBreed.*, 631 (527): 224-234.
- Sahoo, KK., Tripathi, AK., Pareek, A., Sopory, SK. and Pareek, SS., 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods*, 7 (49): 11.
- Sambrook, J. and Russel, DW., 2001. A laboratory Manual, 3rd ed. New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Sawant, GB., Sawardekar, SV., Bhave, SG. and Kshirsagar, JK., 2018. Effect of acetosyringone and age of callus on *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) calli. *International Journal of Chemical studies*, 6(3): 82-88.
- Slamet, IH., Chadha, PM. and Torrizo L., 2014. *Agrobacterium*-Mediated transformation: Rice transformation. *Cereal Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. F. Robert JH and Agnelo. - New York : Springer Science+Business Media. Vol: 1099.
- Toriyama, K. and Hinata, K., 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.*, 41:179-183.
- Visarada, KB., Sailaja, M. and Sarma, NP., 2002. Effect of callus induction media on morphology of embryogenic calli in rice genotypes. *Biology Plant*, 45:495-502.

### Factors affecting *Agrobacterium* - mediated transformation efficiency of Bac thom 7 rice cultivars using immature embryos by *Agrobacterium tumefaciens*

Vu Hoai Sam, Pham Thi Van, Cao Le Quyen, Pham Xuan Hoi, Nguyen Duy Phuong

#### Abstract

Bac thom 7 is one of the main rice varieties and favored in Vietnam. A rice-transformation protocol should be established in order to to apply the genome editing technology for improving the quality of BT7 rice cultivar. Callus from the immature embryos had better regeneration ability than the mature ones for the indica rice. In this study, some factors such as explant age, *Agrobacterium* density, acetosyringone concentration and length of co-cultivation days affecting efficiency of the genetic transformation for BT7 rice cultivar were determined. The results showed that the embryo age of 11-13 DAP co-cultured with a solution of *A. tumefaciens* with  $OD_{600nm} = 0.3$  on the medium supplemented with  $150 \mu M$  acetosyringone for 5 days reached 20.56% of the transgenic efficiency.

**Keywords:** Bac thom 7, transformation, immature embryo, *Agrobacterium*, acetosyringone

Ngày nhận bài: 10/7/2020  
Ngày phản biện: 18/7/2020

Người phản biện: PGS. TS. Lê Hùng Lĩnh  
Ngày duyệt đăng: 23/7/2020