

not rice in the field, the fertilizer was not supplied and there not water the water level in the field was withdrawn previously to harvest rice, leading to the amount of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O at 1-week after harvesting decreased compared to the time of rice cultivation. Total greenhouse gas emissions for the whole season (or global warming potential in tCO<sub>2</sub>e/ha) in the improved model in ecological sub-regions was reduced in comparison to farmer's cultivation. Thus, the research results showed that advanced rice cultivation methods contribute to reducing greenhouse gas emissions in agriculture more effectively than traditional farming methods.

**Keywords:** CH<sub>4</sub> gas, N<sub>2</sub>O gas, global warming potential, ecological sub-region

Ngày nhận bài: 06/9/2020  
Ngày phản biện: 20/9/2020

Người phản biện: PGS. TS. Mai Văn Trịnh  
Ngày duyệt đăng: 25/11/2020

## HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP BIẾN NẠP GEN QUA VI KHUẨN *Agrobacterium* SỬ DỤNG MÔ SẼO PHÔI HOÁ CHO GIỐNG LÚA J02 VÀ ĐS1

Hoàng Thị Giang<sup>1</sup>, Vũ Thị Hương<sup>1</sup>, Trần Hiền Linh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Tiến hành nghiên cứu tối ưu phương pháp tạo mô sẹo phôi hóa và tái sinh cây cho hoàn thiện quy trình biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* cho hai giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1. Kết quả nghiên cứu cho thấy mô sẹo phát sinh trên nền môi trường NB cho kích thước mô sẹo phôi hoá lớn hơn trên nền môi trường MS. Cấu trúc khối mô sẹo to và tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 89%, thích hợp cho biến nạp gen. Nền môi trường NB kết hợp chiếu sáng 12 h cho tỷ lệ tái sinh cao nhất. Để đồng nuôi cấy mô sẹo phôi hoá, mật độ quang vi khuẩn 0,3 được xác định là thích hợp nhất. Đánh giá được biểu hiện của gen *GUS* ở mô sẹo chuyển gen và cây chuyển gen tái sinh, điều đó chứng tỏ hiệu quả của quy trình biến nạp. Hiệu quả biến nạp gen ở hai giống lúa nghiên cứu đạt 60,0 - 66,94%.

**Keywords:** *Agrobacterium*, biến nạp gen, lúa *Japonica*, mô sẹo phôi hoá

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là cây lương thực quan trọng nhất của Việt Nam với sản lượng dự kiến năm 2020 đạt 43,5 triệu tấn thóc, xuất khẩu 6,5 - 6,7 triệu tấn gạo (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2020). Việt Nam là nước xuất khẩu gạo thứ 3 trên thế giới, chiếm gần 20% thị phần toàn cầu, góp phần quan trọng vào việc ổn định an ninh lương thực khu vực và thế giới. Tuy nhiên, sản xuất lúa gạo ở nước ta đang phải đối mặt với rất nhiều thách thức như áp lực tăng năng suất do dân số tăng nhanh, diện tích canh tác bị thu hẹp và những ảnh hưởng của biến đổi khí hậu đã gây ra những thiệt hại lớn cho ngành trồng lúa. Hơn nữa, yêu cầu về chất lượng gạo ngày càng cao hơn cùng với sự phát triển của nền kinh tế xã hội và nhu cầu cải thiện điều kiện sống của người dân.

Một số giống lúa chủ lực của Việt Nam hiện nay tuy năng suất cao và chất lượng tốt nhưng không thơm và thường mắc cảm với các loại bệnh dịch hại. Trong đó, hai giống *Japonica* J02 và ĐS1 là giống chất lượng tốt nhưng lại không có mùi thơm và dễ nhiễm bệnh khô vằn. Vì vậy, việc chọn tạo và cải

tiến các tính trạng mong muốn ở những giống lúa chủ lực *Japonica* như J02 và ĐS1 trong sản xuất là rất cần thiết.

Gần đây, chỉnh sửa hệ gen sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 ra đời đã nhanh chóng trở thành công cụ mạnh mẽ trong việc nghiên cứu cải tạo giống. Li và cộng tác viên (2016) đã ứng dụng thành công công nghệ CRISPR/Cas9 để gây đột biến ở một số gen liên quan đến năng suất lúa như *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* và *IPA1* liên quan đến số hạt/bông, cấu trúc bông, kích thước hạt và cấu trúc của cây lúa. Butt và cộng tác viên (2018) cũng sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để gây đột biến gen *CCD7*, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp Strigolactone, một loại hoocmon gây ức chế quá trình đẻ nhánh. Cây lúa đột biến gen *CCD7* đẻ nhiều nhánh hơn và có chiều cao thấp hơn cây đối chứng. Tuy vậy, phần lớn các nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 được tiến hành trên các giống lúa mô hình, rất khó để áp dụng cho các giống lúa thương mại do chưa có quy trình biến nạp gen cho các giống này.

<sup>1</sup> Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp

Cây lúa chuyển gen đầu tiên được tạo ra qua biến nạp gen trực tiếp vào tế bào trần bằng xung điện bởi Toriyama và cộng tác viên (1988), bằng PEG bởi Zhang và cộng tác viên (1988), tiếp theo bằng súng bắn gen bởi Christou và cộng tác viên (1991), và bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bởi Hiei và cộng tác viên (1994). Trong đó, công trình của Hiei và cộng tác viên (1994) đã đánh dấu bước tiến bộ quan trọng trong kỹ thuật biến nạp gen vào lúa *Japonica* sử dụng *A. tumefaciens*. Hiei và cộng tác viên (1994) đã xây dựng được phương pháp biến nạp gen hiệu quả vào mô sẹo phôi hoá cho một số giống lúa *Japonica* Tsukinohikari, Asanohikari và Koshihikari. Từ đó, kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi và cải tiến ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Tại Việt Nam, nhiều cơ quan nghiên cứu như Viện Di truyền Nông nghiệp đã nghiên cứu cải tiến thành công phương pháp biến nạp gen vào giống lúa *Japonica* Taichung 65 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* với hiệu suất biến nạp gen cao (90,24%) (Hoàng Thị Giang và *ctv.*, 2015) phục vụ nghiên cứu chức năng gen.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu cải tiến phương pháp tạo mô sẹo, tái sinh cây hoàn chỉnh và hoàn thiện phương pháp biến nạp gen qua vi khuẩn *A. tumefaciens* phù hợp cho hai giống lúa *Japonica* thương mại J02 và ĐS1, phục vụ nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm hạt lúa chín của hai giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1 do tác giả giống là GS.TS. Đỗ Năng Vịnh, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp. Vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105 mang vector pCAMBIA5300 GUS được sử dụng để biến nạp gen và do Phòng thí nghiệm Việt Pháp, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp. Các nền môi trường cơ bản được sử dụng trong nghiên cứu gồm môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) và môi trường NB (Hiei and Komari, 2008). Môi trường NB là sự kết hợp các thành phần khoáng đa lượng của Chu (1975) và thành phần khoáng vi lượng và vitamin của Gamborg và cộng tác viên (1968).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

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

Áp dụng theo quy trình cải tiến của Guiderdoni và cộng tác viên (1998).

**Thí nghiệm 1. Nghiên cứu môi trường tạo mô sẹo phôi hoá:** Hạt lúa chín được bóc vỏ và khử trùng bằng cồn 70% và dung dịch javel (Hoàng Thị Giang

và *ctv.*, 2015). Cây 10 hạt đã khử trùng lên mỗi đĩa petri (90 × 150mm) (Hoàng Thị Giang và *ctv.*, 2015) có chứa môi trường tạo mô sẹo với các nền môi trường khác nhau: CT1: nền môi trường NB; CT2: nền môi trường MS. Sau 23 - 26 ngày tiến hành đánh giá tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo, kích thước mô sẹo phôi hoá. Độ tươi của mô sẹo được đánh giá theo hình thức cho điểm: 1 - mô sẹo tươi, 3 - mô sẹo chai răn (Wanichananan và *ctv.*, 2010).

**Thí nghiệm 2. Nghiên cứu môi trường tái sinh mô sẹo phôi hoá:** Giai đoạn này gồm 2 bước là tiền tái sinh và tái. Mô sẹo phôi hoá được chuyển sang môi trường tiền tái sinh (có bổ sung 30 g/l sucrose, 500 mg/l L-proline, 500 mg/l L-glutamine, 300 g/l caseine hydrolysat, 100 mg/l myo-inositol, 5 mg/l ABA, 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA và 7 g/l phytigel) một tuần, sau đó cấy sang môi trường tái sinh (có bổ sung 30 g/l sucrose, 500 mg/l L-proline, 500 mg/l L-glutamine, 300 g/l caseine hydrolysat, 100 mg/l myo-inositol, 3 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA và 4,5 g/l phytigel), 4 - 6 mô sẹo/đĩa petri, để trong phòng nuôi cây với nhiệt độ phòng 26-28°C. Thực hiện 4 công thức thí nghiệm: CT1: nền môi trường NB + 12 giờ chiếu sáng; CT2: nền môi trường MS + 12 giờ chiếu sáng; CT3: nền môi trường NB + 24 giờ chiếu sáng; CT4: nền môi trường MS + 24 giờ chiếu sáng. Sau 3-4 tuần tiến hành đánh giá tỷ lệ tái sinh chồi.

**Thí nghiệm 3. Nghiên cứu phương pháp đồng nuôi cấy mô sẹo với vi khuẩn:** Đồng nuôi cấy mô sẹo phôi hoá với dịch khuẩn *A. tumefaciens* ở các mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ) khác nhau: CT1: 0,01; CT2: 0,05; CT3: 0,1; CT4: 0,3; CT5: 0,5. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy với vi khuẩn, các mẫu mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc lần I có bổ sung kháng sinh cefotaxime 400 mg/l, vancomycin 100 mg/l để loại bỏ vi khuẩn và kháng sinh hygromycin 50 mg/l để sàng lọc tế bào chuyển gen. Sau một tuần tiến hành đánh giá tỷ lệ mẫu nhiễm và hiệu quả biểu hiện gen *GUS*. Hiệu quả biểu hiện của gen *GUS* được đánh giá bằng phương pháp nhuộm mô với dung dịch X-Gluc.

**Thí nghiệm 4. Đánh giá hiệu quả biến nạp gen:** Sau chọn lọc lần I, mẫu cấy được chuyển sang môi trường chọn lọc II 3 tuần để tăng hiệu quả chọn lọc và kích thích phát sinh mô sẹo mới từ mẫu mô sẹo chuyển gen. Các loại kháng sinh được bổ sung vào môi trường chọn lọc I và II tương tự nhau. Chuyển những mô sẹo mới phát sinh kháng kháng sinh sang môi trường tiền tái sinh và tái sinh, áp dụng môi trường nuôi cấy từ kết quả của thí nghiệm 2. Hiệu quả biến nạp gen được đánh giá bằng tỷ lệ cây lúa tái sinh biểu hiện gen *GUS* khi nhuộm mô trên tổng số cây phân tích.

Các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp, với 20-30 mẫu cấy cho mỗi công thức thí nghiệm trong một lần lặp. Ở các bước thí nghiệm, trừ giai đoạn tái sinh, mẫu cấy được nuôi trong tối ở 28°C.

**2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu**

Xử lý số liệu trên Excel và dùng hàm Ttest hoặc phân tích ANOVA bằng phần mềm IBM SPSS Statistics để kiểm định sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm.

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

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 08/2019 -

10/2020 tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Đánh giá hiệu quả của một số môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa**

Để thử nghiệm cho hai giống lúa Japonica thương mại của Việt Nam, ngoài nền môi trường NB như mô tả trong quy trình của Hiei do Guiderdoni và cộng tác viên (1998) cải tiến, nền môi trường MS cũng được đưa vào đánh giá. Kết quả thí nghiệm được tổng hợp trong bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa

Giống lúa	Công thức thí nghiệm	Nền môi trường	Tổng số mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Kích thước mô sẹo phôi hóa (mm)	Độ toi của mô sẹo
J02	CT1	MS	121	93,33 ± 1,88 <sup>a</sup>	9,35 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,0 ± 0 <sup>a</sup>
	CT2	NB	115	89,44 ± 3,07 <sup>a</sup>	9,95 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,0 ± 0 <sup>a</sup>
ĐS1	CT1	MS	170	93,53 ± 1,91 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,0 ± 0 <sup>a</sup>
	CT2	NB	170	96,47 ± 1,19 <sup>a</sup>	9,23 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,0 ± 0 <sup>a</sup>

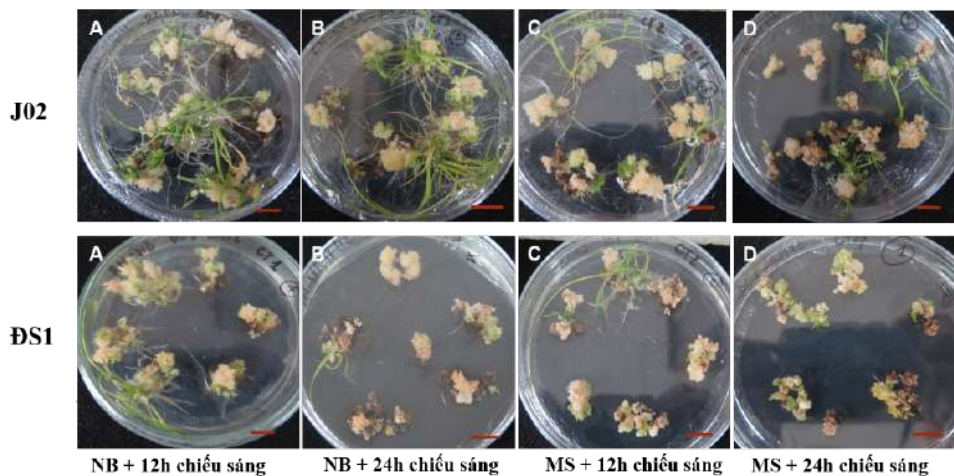
Ghi chú: Trong cùng một cột của mỗi giống lúa, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với P < 0,05.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ phát sinh mô sẹo phôi hóa ở 2 giống lúa nghiên cứu rất cao, đạt ≥ 89% trên cả hai nền môi trường NB và MS và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai công thức thí nghiệm (Bảng 1). Kích thước mô sẹo phôi hóa ở 2 giống dao động từ 8,48 - 9,95 mm, tuy nhiên nền môi trường NB cho kích thước mô sẹo lớn hơn nền môi trường MS. Trên cả 2 công thức thí nghiệm, 2 giống Japonica J02 và ĐS1 đều hình thành

mô sẹo phôi hóa toi (đạt điểm 1), dễ phân tách thành các mô sẹo nhỏ.

**3.2. Ảnh hưởng của một số môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đến hiệu quả tái sinh cây từ mô sẹo phôi hóa**

Với khả năng hình thành mô sẹo phôi hóa tốt ở hai giống J02 và ĐS1, tiếp tục sử dụng mô sẹo phôi hóa thu được để làm vật liệu đánh giá khả năng tái sinh.



**Hình 1.** Tái sinh mô sẹo phôi hóa

Ghi chú: A: NB + 12 giờ chiếu sáng; B: NB + 24 giờ chiếu sáng; C: MS + 12 giờ chiếu sáng; D: MS + 24 giờ chiếu sáng.

Các giống lúa *Japonica* được đánh giá là rất dễ tái sinh. Theo quy trình cải tiến của Guiderdoni và cộng tác viên (1998), quá trình tái sinh được chia làm hai giai đoạn: tiền tái sinh và tái sinh cây hoàn chỉnh. Môi trường nuôi cấy cho giai đoạn tiền tái sinh được bổ sung 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 5 mg/l ABA, nuôi cấy 1 tuần trong tối để tăng cường khả năng phân hóa của tế bào. Sau 1 tuần chuyển sang môi trường tái sinh với 3 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA. Khi chuyển sang môi trường tái sinh quan sát thấy từ mỗi mô sẹo ban đầu phát sinh mô sẹo mới. Sau khoảng 10 ngày bắt đầu xuất hiện những đốm màu xanh trên những mô sẹo mới và hình thành chồi (Hình 1). Kết quả nghiên cứu được tổng hợp trong bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nền môi trường và thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tái sinh cây

Giống lúa	Nền môi trường	Thời gian chiếu sáng(h)	Σ mẫu cấy	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)
J02	NB	12	58	79,33 ± 3,23 <sup>a</sup>
		24	60	80,00 ± 3,33 <sup>a</sup>
	MS	12	72	55,56 ± 5,56 <sup>b</sup>
		24	26	53,33 ± 3,33 <sup>b</sup>
ĐS1	NB	12	46	51,67 ± 6,67 <sup>a</sup>
		24	32	7,62 ± 3,62 <sup>c</sup>
	MS	12	96	31,25 ± 6,63 <sup>b</sup>
		24	48	4,17 ± 4,17 <sup>c</sup>

Ghi chú: Trong cùng một cột của mỗi giống lúa, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $P < 0,05$ .

Số liệu ở bảng 2 cho thấy giống J02 dễ tái sinh hơn ĐS1, cụ thể, tỷ lệ tái sinh chồi dao động từ 53,33 - 79,33% ở giống J02 và 4,17 - 51,67% ở giống ĐS1. Đối với giống J02, thời gian chiếu sáng không ảnh hưởng tới tỷ lệ tái sinh chồi, nhưng ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nền môi trường NB và MS. Trong đó, nền môi trường NB cho tỷ lệ tái sinh cao hơn, đạt ~80%, còn ở nền môi trường MS chỉ đạt 53 - 55% (Hình 1). Thí nghiệm trên giống ĐS1 ghi nhận kết quả khác so với giống J02. Thời gian chiếu sáng 12 giờ cho hiệu quả tái sinh vượt trội so với thời gian chiếu sáng 24 giờ (<10%), đạt 31,25 - 51,67% (Hình 1). Bên cạnh yếu tố thời gian chiếu sáng cũng đánh giá thấy ảnh hưởng rõ rệt của nền môi trường nuôi cấy. Với 12h chiếu sáng, nền môi trường NB cho tỷ lệ tái sinh 51,67%, cao hơn nền môi trường MS (31,25%).

**3.3. Xác định mật độ quang tối ưu của dịch khuẩn cho biến nạp gen**

Một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* chính là mật độ của vi khuẩn khi lây nhiễm. Mật độ vi khuẩn là số tế bào vi khuẩn trong một đơn vị thể tích. Lượng tế bào vi khuẩn quá thấp sẽ làm giảm hiệu quả tiếp xúc của vi khuẩn với các mẫu thực vật, khi mật độ vi khuẩn quá cao làm ảnh hưởng tới sự phát triển của mẫu thực vật và gây nhiễm mẫu ở sau giai đoạn đồng nuôi cấy. Do đó, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm để xác định mật độ quang vi khuẩn thích hợp nhất cho biến nạp gen vào 2 giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1.

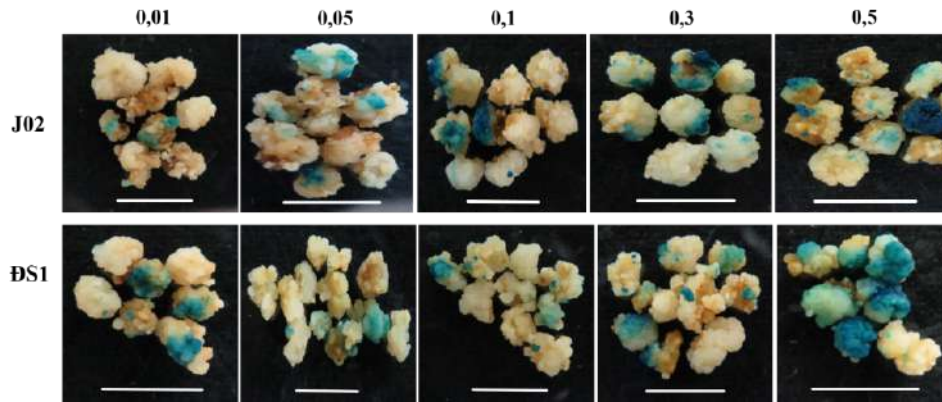
**Bảng 3.** Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen vào mô sẹo phôi hoá

Giống lúa	Mật độ quang vi khuẩn (OD <sub>600nm</sub> )	Tổng số mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Hiệu quả biểu hiện gen (%)
J02	0,01	79	7,64 ± 2,52 <sup>a</sup>	37,22 ± 9,37 <sup>a</sup>
	0,05	77	11,67 ± 4,07 <sup>a</sup>	57,02 ± 8,16 <sup>ab</sup>
	0,1	80	12,5 ± 3,13 <sup>a</sup>	46,48 ± 8,05 <sup>a</sup>
	0,3	75	6,53 ± 3,41 <sup>a</sup>	74,42 ± 7,76 <sup>b</sup>
	0,5	40	15,0 ± 2,89 <sup>a</sup>	77,92 ± 4,0 <sup>b</sup>
ĐS1	0,01	107	14,14 ± 2,16 <sup>a</sup>	42,01 ± 6,03 <sup>a</sup>
	0,05	80	15,0 ± 4,23 <sup>a</sup>	53,35 ± 5,62 <sup>ab</sup>
	0,1	114	18,08 ± 3,31 <sup>a</sup>	54,02 ± 4,86 <sup>ab</sup>
	0,3	79	14,03 ± 2,74 <sup>a</sup>	69,87 ± 4,91 <sup>bc</sup>
	0,5	120	26,67 ± 3,33 <sup>b</sup>	73,97 ± 7,14 <sup>c</sup>

Ghi chú: Trong cùng một cột của mỗi giống lúa, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $P < 0,05$ .

Kết quả nghiên cứu cho thấy mật độ quang vi khuẩn ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu nhiễm cũng như hiệu quả biểu hiện gen (Bảng 3). Ở các thí nghiệm với mật độ vi khuẩn  $OD_{600nm} = 0,5$ , sau 3 ngày đồng nuôi cấy quan sát thấy vi khuẩn bắt đầu phát sinh mạnh xung quanh mẫu mô sẹo. Sau 1 tuần

trên môi trường chọn lọc, tỷ lệ mẫu nhiễm khá cao ở giống ĐS1 (26,67% - sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức còn lại) và giống J02 (15,0%). Hiệu quả biểu hiện gen ở công thức này ở ĐS1 và J02 lần lượt là 77,92% và 73,97% (Bảng 3, hình 2).

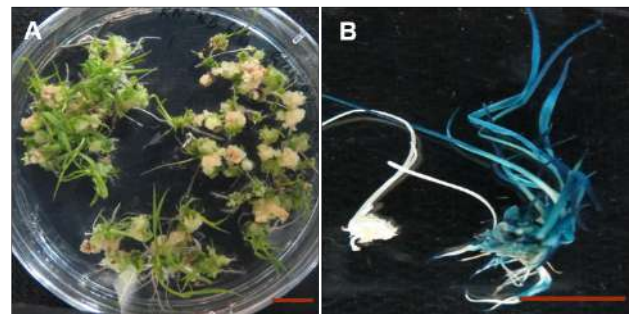


**Hình 2.** Hình ảnh biểu hiện gen *GUS* ở 5 công thức mật độ quang của dịch khuẩn: 0,01, 0,05, 0,1, 0,3 và 0,5

Bốn công thức mật độ quang vi khuẩn còn lại (0,01, 0,05, 0,1 và 0,3) cho tỷ lệ mẫu nhiễm gần như nhau (6,53 - 12,5% đối với giống J02, 14,03 - 18,08% đối với giống ĐS1), không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 3). Tuy nhiên, đánh giá thấy hiệu quả biểu hiện gen ở các mật độ quang vi khuẩn  $OD_{600nm} = 0,01, 0,5$  và  $0,1$  tương đối thấp, dao động từ 37,22 - 57,02% đối với J02, 42,01 - 54,02% đối với ĐS1. Với  $OD_{600nm} = 0,3$ , hiệu quả biểu hiện gen tốt nhất, ở mức tương đương như sử dụng  $OD_{600nm} = 0,5$ : đạt 74,42% ở J02 và 69,87% ở ĐS1 (Bảng 3, Hình 2). Như vậy, dịch khuẩn ở mật độ quang  $OD_{600nm} = 0,3$  thích hợp nhất để lây nhiễm mô sẹo phôi hoá của 2 giống lúa J02 và ĐS1. Theo quy trình cải tiến của Guiderdoni và cộng tác viên (1998), dịch vi khuẩn được sử dụng với mật độ quang 1,0 để lây nhiễm với mô sẹo phôi hóa của các giống lúa *Japonica*. Ratnayake và Hettiarachchi (2010) cũng sử dụng dịch khuẩn GV3101 với mật độ quang 1,0 để lây nhiễm với mô sẹo của giống lúa Sri Lanka nhưng hiệu quả chuyển gen cao nhất chỉ đạt 20%.

**3.4. Hiệu quả biến nạp gen sử dụng mô sẹo phôi hóa**

Từ mỗi dòng mẫu cấy kháng kháng sinh được chuyển sang giai đoạn tái sinh, lấy 2 cây tái sinh để nhuộm với dung dịch X-GUS để đánh giá biểu hiện của gen *GUS* (Hình 3).



**Hình 3.** Hình ảnh tái sinh mô sẹo chuyển gen (A) và biểu hiện của gen *GUS* ở cây tái sinh (B)

Phân tích kết quả đánh giá biểu hiện gen *GUS* ở cây tái sinh (Bảng 4) cho thấy tỷ lệ các cây chuyển gen dương tính khá cao. Đối với giống J02, phân tích 125 cây tái sinh thì thu được 75 cây biểu hiện gen *GUS*, hiệu quả biến nạp gen đạt 60,0%. Ở giống ĐS1 thu được 59 cây có biểu hiện gen *GUS* trên tổng số 90 cây đem đánh giá, hiệu quả biến nạp gen đạt 66,94%. Tuy cùng thuộc nhóm lúa *Japonica* nhưng hiệu quả biến nạp gen của J02 và ĐS1 kém hơn so với giống mô hình Taichung65 (đạt 90,24%) (Hoàng Thị Giang và *ctv.*, 2015).

**Bảng 4.** Kết quả phân tích hiệu quả biến nạp gen sử dụng mô sẹo phôi hoá

Giống lúa	Σ cây phân tích	Σ cây dương tính	Hiệu quả biến nạp gen (%)
J02	125	75	60,0 ± 3,56
ĐS1	90	59	66,94 ± 3,86

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, đối với hai giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1, nền môi trường NB có ưu thế hơn môi trường MS để nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa, với tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 89%, cấu trúc khối mô sẹo tối thích hợp cho nghiên cứu chuyển gen. Để tái sinh mô sẹo phôi hóa cho cả 2 giống nên sử dụng nền môi trường NB kết hợp chiếu sáng 12h. Mật độ quang của dịch khuẩn OD<sub>600nm</sub> = 0,3 được xác định là thích hợp nhất để đồng nuôi cấy mô sẹo phôi hóa, với tỷ lệ mẫu nhiễm chỉ 6,53-14,03%. Phương pháp biến nạp gen vào mô sẹo phôi hóa cho hiệu quả biến nạp gen ở hai giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1 đạt 60,0 - 66,94%.

### 4.2. Đề nghị

Áp dụng phương pháp biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* sử dụng mô sẹo phôi hóa cho nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen hai giống lúa *Japonica* J02 và ĐS1.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu hoàn thiện phương pháp nuôi cấy *in vitro* cho một số giống lúa chất lượng, nhằm phục vụ chỉnh sửa hệ gen”, thuộc Nhiệm vụ thường xuyên phòng thí nghiệm trọng điểm năm 2019-2020.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2020. Báo cáo chi tiết kế hoạch sản xuất và nhu cầu tiêu thụ lúa, gạo năm 2020, ngày truy cập 05/10/2020. Địa chỉ: <https://thoibaokinhdoanh.vn/viet-nam/bo-nn-amp-ptnt-bao-cao-gi-ve-san-xuat-va-tieu-thu-gao-trong-nam-nay-1066516.html>.

Hoàng Thị Giang, Mai Đức Chung, Nguyễn Thị Huế, Jeremy Lavarenne, Mathieu Gonin, Nguyễn Thanh Hải, Đỗ Năng Vịnh, Pascal Gantet, 2015. Hoàn thiện phương pháp chuyển gen cho giống lúa taichung 65 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(5): 764-773.

Butt H., Jamil M., Wang J.Y., Al-Babili S., & Mahfouz M., 2018. Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alteration of strigolactone biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 18(1): 174.

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.

Chu C.C., 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: *Proc. Symp. Plant Tissue Culture* (pp. 43-50). Science Press, Peking.

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., 1968. Plant cell cultures 1, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158.

Guiderdoni E. group and Harry C. Hoge group, 1998. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic *Japonica* rice plants. BIOTROP program, CIRAD, Montpellier, France.

Hiei Y., Komari T., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols*, 3(5): 824-834.

Hiei Y., Ohta S., Komari I., Rumashiro L., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Planta*, 56: 271-282.

Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G. and Li H., 2016. Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.*, 7: 377.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Nitsch J.P., Nitsch C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.

Ratnayake R.M.L.K. and Hettiarachchi G.H.C.M., 2010. Development of an efficient *Agrobacterium* mediated transformation protocol for Sri Lankan rice variety - Bg 250. *Tropical Agricultural Research*, 22 (1): 45-53.

Toriyama K., Arimoto Y., Uchimeya H., Himata K., 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Biotechnology*, 6: 1072-1074.

Wanichananan P., Teerakathiti T., Roytrakul S., Kirdmanee C. and Peyachoknagul S., 2010. A highly efficient method for *Agrobacterium* mediated transformation in elite rice varieties (*Oryza sativa* L. spp. *Indica*). *African Journal of Biotechnology*, 9(34): 5488-5495.

Zhang H.M., Yang H., Rech E.L., Golds T.J., Davis A.S., Mulligan B.J., Cocking E.C., Davey M.R., 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Reports*, 7: 379-384.

## An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method of embryogenic callus for Vietnamese *Japonica* rice varieties J02 and DS1

Hoang Thi Giang, Vu Thi Huong, Tran Hien Linh

### Abstract

This study was carried out to establish an efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of two Vietnamese *Japonica* rice varieties, J02 and DS1. Before transformation, embryogenic callus induction and plant regeneration were evaluated. In comparison with MS basal medium, NB basal medium was more efficient to form larger average size of callus. Friable callus type and callus induction rate of above 89% were achieved. The highest regeneration rate was observed on NB basal medium under 12 hour photoperiod. *Agrobacterium* suspension at optical density of 0.3 was suitable for transformation. The expression of *GUS* gene was examined in callus and plantlets that revealed successful transformation. The transformation efficiency of 60.0 - 66.94% was obtained for both varieties.

**Keywords:** *Agrobacterium*, transformation, *Japonica* rice, embryogenic callus, J02, DS1

Ngày nhận bài: 29/10/2020

Người phản biện: TS. Dương Xuân Tú

Ngày phản biện: 20/11/2020

Ngày duyệt đăng: 25/11/2020

## QUY TỤ GEN *Ph2* VÀ *Ph3* TRONG CHỌN TẠO GIỐNG CÀ CHUA KHÁNG BỆNH SƯƠNG MAI

Trần Ngọc Hùng<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Hiền<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Bệnh sương mai do nấm *Phytophthora infestans* gây hại cà chua, đặc biệt nghiêm trọng trong vụ Đông Xuân ở Đồng bằng sông Hồng và mùa mưa ở vùng cao nguyên nước ta. Lây bệnh nhân tạo với các mẫu nấm sương mai thu thập tại Lâm Đồng, Hà Nội, Lào Cai cho thấy gen *Ph1* có trong mẫu giống Nova hoàn toàn không thể hiện tính kháng bệnh. Gen *Ph2* trong mẫu giống LA3151 không thể hiện tính kháng tốt như gen *Ph3* có trong dòng CLN2037B nhưng cũng giảm rõ rệt chỉ số bệnh và số bào tử tạo ra trên vết bệnh. Thông qua lai tạo và chọn lọc bằng chỉ thị phân tử UF-*Ph2*-1 liên kết với gen *Ph2* và chỉ thị Ph3-gsm1 cho gen *Ph3* đã quy tụ được các gen này trong dòng cà chua F<sub>5</sub> có đặc điểm nông sinh học tốt. Tính kháng bệnh sương mai của dòng cà chua F<sub>5</sub> mang cả 2 gen *Ph2* và *Ph3* cao hơn hẳn dòng bố mẹ chỉ mang 1 gen, và là nguồn vật liệu tốt cho chọn giống cà chua.

**Từ khóa:** Cà chua (*Solanum lycopersicum*), bệnh sương mai, nấm *Phytophthora infestans*, chỉ thị phân tử, quy tụ gen

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) là một trong 4 cây trồng có ý nghĩa kinh tế quan trọng nhất (sau lúa gạo, lúa mì và đậu tương) (Nowicki *et al.*, 2013). Năm 2014, sản xuất cà chua toàn cầu đạt 162 triệu tấn với giá trị đạt trên 62 tỉ USD (FAO, 2017).

Bệnh sương mai do nấm *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary được xác định là mối nguy hại chính trong sản xuất cà chua ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới (Lima *et al.*, 2009; Elsayed *et al.*, 2012). Nấm bệnh hại mọi bộ phận trên cây: lá, thân, quả... ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng, làm giảm năng suất và chất lượng (Lievens *et al.*, 2004). Bệnh phát tán nhanh và làm chết cây khi ẩm độ cao và nhiệt

độ thấp (18°C) (Haq *et al.*, 2008; Stroud *et al.*, 2016). Nấm *P. infestans* rất đa dạng và có 2 hình thức sinh sản là vô tính và hữu tính. Do đó, độc tính của nấm có thể tăng lên và làm mất tính kháng bệnh của cây trồng (McDonald and Linde, 2002). Hầu hết các loại thuốc không có tác dụng khi bệnh xuất hiện, đặc biệt là các loại thuốc có hoạt chất metalaxyl (Randall *et al.*, 2014; Saville *et al.*, 2015; Montes *et al.*, 2016). Sử dụng giống cà chua chống chịu bệnh là giải pháp tối ưu để quản lý bệnh sương mai.

Một số giống cà chua chống chịu bệnh sương mai đã tạo ra nhờ đưa gen kháng bệnh từ các mẫu giống cà chua hoang dại (Panthee and Gardner, 2010). Hiện nay, 5 gen kháng bệnh sương mai đã công bố.

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Rau Quả, <sup>2</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam