

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TÁI SINH VÀ CHUYỂN GENE NHỜ VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens* Ở MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU NÀNH

ASSESSMENT OF REGENERATION AND *Agrobacterium tumefaciens*-  
MEDIATED TRANSFORMATION IN SOME SOYBEAN CULTIVARS

Phan Lê Tư, Tôn Bảo Linh, Nguyễn Vũ Phong  
Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh  
Email: [nyphong@hcmuaf.edu.vn](mailto:nyphong@hcmuaf.edu.vn)

## TÓM TẮT

Đậu nành là cây trồng quan trọng sử dụng chủ yếu làm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Đã có nhiều nỗ lực tạo giống đậu nành bằng phương pháp truyền thống nhưng bị hạn chế bởi sự tự thụ phấn của nó. Để tạo cây biến đổi gene cần xác định khả năng tái sinh của giống và một số yếu tố liên quan đến chuyển gene nhờ vi khuẩn. Trong sáu giống đậu nành nghiên cứu, giống HLDN29, DT22, DT84, MTD176 có khả năng tái sinh chồi và tạo chồi tốt. Khả năng tạo rễ của các giống đậu nành tương đương nhau. Thử nghiệm chuyển gene cho thấy khi bổ sung lipoic acid vào môi trường cảm ứng tạo chồi, đốt lá mầm sau lây nhiễm vi khuẩn ít bị hóa nâu, mẫu tái sinh tạo chồi tốt hơn so với đối chứng. Khi chọn lọc bằng kháng sinh hygromycin 10 mg.L<sup>-1</sup> đã thu được 5 chồi sống sót, trong đó có 2 chồi đậu nành hiện diện gene *hptII* kháng hygromycin qua xác định bằng kỹ thuật PCR.

**Từ khóa:** *Agrobacterium*, đậu nành, hygromycin, lipoic acid, tái sinh.

## ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is a major source for food and animal feed and globally vegetable oil production. Significant efforts have been made in soybean breeding through conventional approaches but are limited by its self-pollination ability. Commercially available cultivars were used to produce transgenic soybeans. Their regenerative capacity and some relevant factors for successful genetic transformation were identified. The regeneration of the soybean cultivars was evaluated through shoot and root formation, shoots elongation, and adaptation of plantlets in acclimatization period. While shoot-regeneration was well in HLDN29, DT22, DT84, and MTD176 cultivars, rooting capacity of investigated cultivars was the same. *In vitro* plantlets were well acclimatized under nursery conditions. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation showed that lipoic acid was efficient in reducing browning or necrosis of cotyledonary nodes during bacterial co-cultivation. Selective medium containing 10 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin was appropriate for screening of putative transformed shoots. Of the five shoots regenerated on selective media, two individuals were proved to be transformed by PCR analysis of hygromycin resistance gene (*hptII*).

**Keywords:** *Agrobacterium*, hygromycin, lipoic acid, soybean, regeneration.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu nành (*Glycine max* (L.) Merrill) là một trong những loại cây công nghiệp ngắn ngày quan trọng cung cấp protein và dầu thực vật trên thế giới (Khan và ctv, 2004). Do có giá trị dinh dưỡng cao nên đậu nành được xếp vào dạng cây trồng “thực phẩm chức năng” và đóng vai trò thiết yếu nâng cao tiêu chuẩn thực phẩm cho người thiếu hụt protein ở những nước đang

phát triển (Chaudhry, 1985). Dầu đậu nành có lượng tiêu thụ lớn nhất trong tổng số dầu thực vật trên thế giới (<https://www.statista.com>).

Là nước nông nghiệp nhưng với cây đậu nành Việt Nam liên tục phải nhập khẩu theo chiều hướng năm sau cao hơn năm trước nhằm bù đắp sự thiếu hụt về thực phẩm protein trong nước và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi và thủy sản. Tại

Việt Nam, đậu nành đã được trồng thương mại hoá ở khắp các vùng trên cả nước. Hiện có khá nhiều giống đậu nành được chọn tạo và phóng thích phù hợp với điều kiện khí hậu, thời tiết và thổ nhưỡng cho từng vùng trồng. Nhu cầu tạo ra giống đậu nành phù hợp thích ứng tốt với sự khác biệt về môi trường và thổ nhưỡng của các vùng trồng rất được quan tâm. Tuy đã có nhiều nỗ lực nhằm cải thiện giống đậu nành thông qua chọn giống truyền thống nhưng kết quả thường bị giới hạn bởi tính tự thụ phấn của loại cây này. Do đó, cần sử dụng các biện pháp chuyển gene để chọn tạo giống mới.

Đậu nành là đối tượng khó thực hiện nuôi cấy *in vitro* và hiệu quả chuyển nạp gene rất thấp do phụ thuộc chủ yếu vào kiểu gene của giống. Các nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy hiệu quả tạo cây chuyển nạp gene chỉ đạt tối đa 4%. Để phục vụ cho các nghiên cứu có liên quan đến biến đổi gene, cần xác định được giống đậu nành đáp ứng chuyển gene cao và một số các yếu tố liên quan thích hợp nhằm nâng cao hiệu quả chuyển nạp gene.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định giống đậu nành thương mại có khả năng tái sinh tốt và một số yếu tố như nồng độ chất chọn lọc, chất chống oxy hóa tác động thuận lợi đến thành công trong việc tạo cây đậu nành chuyển gene nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Giống DT22, DT84, MTD176, HLDN29, HL06, HL07-15 là những giống đậu nành ngắn ngày, năng suất khá và chống chịu khá tốt với sâu bệnh hại phổ biến được cung cấp từ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Trường Đại học Cần Thơ và Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc.

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 được cung cấp từ Phòng Công nghệ gen, Viện Sinh học nhiệt đới. Vector pSM103 chứa các gene *hptII* (kháng hygromycin), gene *aadA* (kháng kanamycin), cassette 35SP-erGFP7INT-NOS, đoạn miR319a của *Arabidopsis* chịu điều khiển bởi promoter

GmUbiIII giúp biểu hiện đoạn microRNA ở cây đậu nành (được cung cấp bởi TS. Andrew F. Bent, University of Wisconsin-Madison, Mỹ).

Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật, vi khuẩn, kháng sinh đạt tiêu chuẩn sinh học phân tử từ công ty Himedia (Ấn Độ), BioBasic (Canada), Thermo Scientific (Mỹ).

### Tái sinh chồi từ đốt lá mầm

Đốt lá mầm được chuẩn bị theo quy trình của Paz và ctv, 2004. Cây mầm *in vitro* 5 ngày tuổi được cắt bỏ phần trụ hạ diệp và rẽ cách đốt lá mầm khoảng 3 - 5 mm. Tiếp theo, chế độ trụ hạ diệp, tách lá mầm thành 2 mẫu cây bằng nhau. Loại bỏ trụ thượng diệp, chồi ngọn và chồi bên, đồng thời dùng dao tạo từ 7 - 10 vết thương tại mặt trong vị trí trụ thượng diệp tiếp giáp lá mầm. Cây đốt lá mầm nghiêng 45° lên môi trường tái sinh (B5 (Gamborg và ctv, 1968); 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose; 8 g.L<sup>-1</sup> agar; 0,59 g.L<sup>-1</sup> MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid); 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BA (6-benzy laminopurine); pH 5,7). Ghi nhận số mẫu tạo chồi, số chồi hình thành, chiều cao chồi hàng tuần trong 4 tuần.

### Tạo cây con hoàn chỉnh

Cụm chồi tái sinh của 6 giống đậu nành được nuôi cấy trên môi trường vươn chồi (MS (Murashige và Skoog, 1962); vitamin B5; 0,59 g.L<sup>-1</sup> MES; 0,1 mg.L<sup>-1</sup> IAA (Indole-3-cetic acid); 0,5 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (gibberellic acid); pH 5,7). Sau 4 tuần những chồi cao từ 2,5 - 3 cm, có từ 2 lá thật được cấy lên môi trường tạo rễ (½MS + ½ vitamin B5 + 0,59 g.L<sup>-1</sup> MES; 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA (Indole-3- butyric acid); pH 5,7). Sau 3 tuần, cây con hoàn chỉnh được thuần hóa ở vườn ươm.

### Xác định nồng độ hygromycin dùng chọn lọc chồi chuyển gene

Chồi 2 tuần tuổi của giống DT22, DT84 và MTD176 được cấy lên môi trường tái sinh chồi bổ sung kháng sinh hygromycin lần lượt là 0; 5; 10 mg.L<sup>-1</sup>. Số mẫu sống, tình trạng mẫu được ghi nhận hàng tuần trong 4 tuần nuôi cấy.

### Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm tái sinh và khảo sát nồng độ hygromycin gây chết tối thiểu được bố trí

theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, với ít nhất hai lần lặp lại độc lập. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 26°C, quang chu kỳ 16/8 giờ (sáng/tối), cường độ ánh sáng 2.000 lux.

### Chuyển gene vào đậu nành

Đốt lá mầm bị gây vết thương được lây nhiễm với 50 ml dung dịch huyền phù vi khuẩn LBA4404 mang vector pSM103 trong 30 phút kết hợp lắc 70 vòng/phút. Quá trình đồng nuôi cấy trên môi trường bán rắn gồm 1/10X B5; 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose; 3,9 g.L<sup>-1</sup> MES; 4 g.L<sup>-1</sup> agar; 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; 1,67 mg.L<sup>-1</sup> BA; 400 mg.L<sup>-1</sup> cysteine; 154,2 mg.L<sup>-1</sup> dithiothreitol; 0,2 mM acetosyringone, pH 5,4 (Paz và ctv, 2004) không bổ sung hoặc bổ sung 0,12 mM lipoic acid. Giữ mẫu trong 4 ngày ở 26°C, ánh sáng mờ 2.000 lux.

Để loại bỏ vi khuẩn, mẫu được rửa với hỗn hợp kháng sinh 100 mg.L<sup>-1</sup> cefotaxime, 50 mg.L<sup>-1</sup> vancomycin, 100 mg.L<sup>-1</sup> timentin và cấy nghiêng 45° trên môi trường tạo chồi chứa 100 mg.L<sup>-1</sup> cefotaxime, 50 mg.L<sup>-1</sup> timentin. Sau 14 ngày, mẫu được chuyển sang môi trường tạo chồi bổ sung 5 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin. Sau 28 ngày, nồng độ chất chọn lọc được tăng lên 10 mg.L<sup>-1</sup>.

### Kiểm tra sự hiện diện gene chuyển

DNA tổng số của chồi giả định chuyển gene được tách chiết bằng GeneJET Plant Genomic

DNA Purification Kit và kiểm tra chất lượng bằng đo mật độ quang và điện di trên gel agarose 1%, 80V, trong 30 phút. Khuếch đại gene *hptII* bằng phản ứng PCR với primer *hptII-F* (5'-AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAA-3') và *hptII-R* (5'-ATCGCCTCGCTCCAGTCAATG-3'). Sản phẩm PCR được khuếch đại có kích thước lý thuyết 508 bp.

### Phân tích thống kê

Số liệu thu thập được chuyển đổi phù hợp trước khi xử lý thống kê, đọc kết quả dựa vào phân tích ANOVA, bảng trung bình và bảng so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức theo trắc nghiệm phân hạng (LSD).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

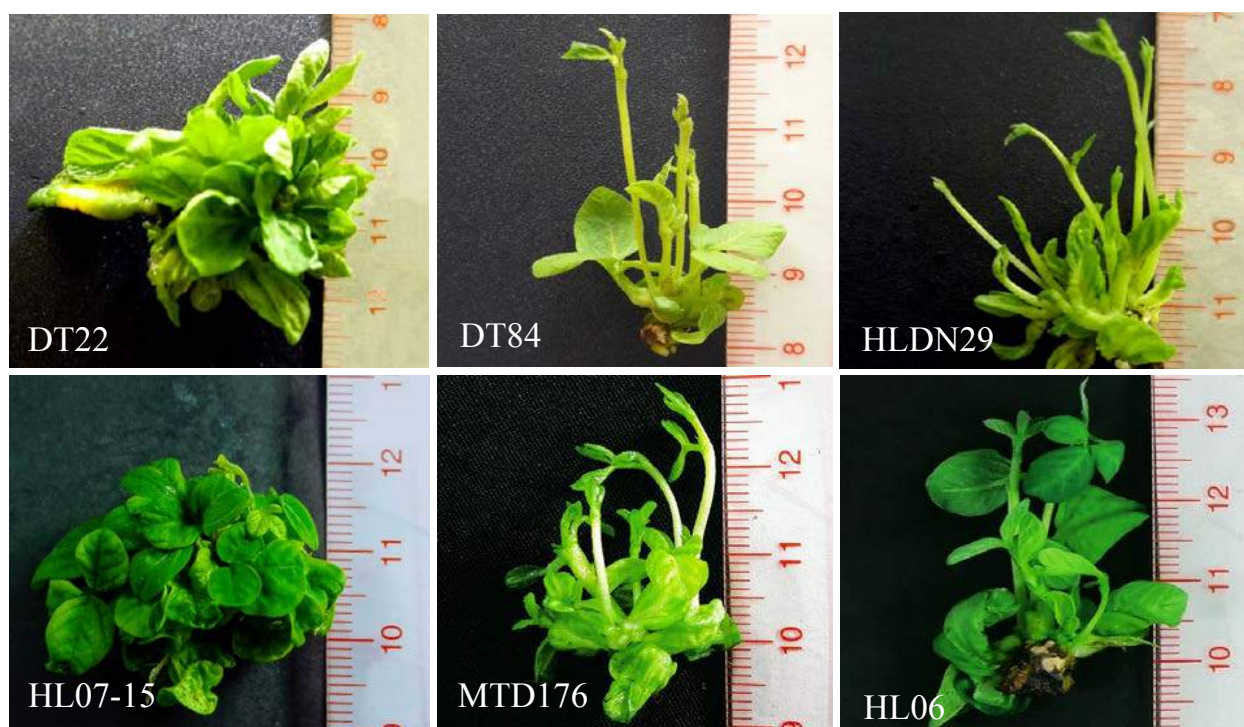
#### Khả năng tạo chồi từ đốt lá mầm của các giống đậu nành

Sau 4 - 5 ngày nuôi cấy đa số các mẫu đều cảm ứng tạo chồi đơn. Sau hai tuần, mỗi đốt lá mầm tạo từ 1-2 chồi, ngoại trừ giống HLDN29 đạt khoảng 2,5 chồi/mẫu. Sang tuần thứ ba, số chồi tạo thành tăng gấp đôi so với tuần thứ hai, trong đó giống HLDN29 vẫn có số chồi cao nhất đạt 4,6 chồi/mẫu. Ở tuần thứ 4, ngoại trừ giống HLDN29, các giống còn lại đều không tạo thành chồi mới.

**Bảng 1.** Khả năng tái sinh chồi từ đốt lá mầm của các giống đậu nành sau 28 ngày nuôi cấy

Giống	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi	Số lá/chồi
DT22	93,3 <sup>a</sup>	3,34 <sup>bc</sup> ± 0,90	2,21 <sup>b</sup> ± 0,53	2,10 <sup>bc</sup> ± 0,61
DT84	86,0 <sup>b</sup>	3,19 <sup>bcd</sup> ± 0,76	2,84 <sup>a</sup> ± 0,65	2,33 <sup>ab</sup> ± 0,76
HL06	78,7 <sup>c</sup>	2,86 <sup>de</sup> ± 0,73	1,71 <sup>c</sup> ± 0,32	1,88 <sup>c</sup> ± 0,45
HL07-15	94,7 <sup>a</sup>	2,90 <sup>cd</sup> ± 0,70	1,97 <sup>b</sup> ± 0,68	2,10 <sup>bc</sup> ± 0,66
HLDN29	91,3 <sup>ab</sup>	5,49 <sup>a</sup> ± 1,62	2,69 <sup>a</sup> ± 0,71	2,50 <sup>a</sup> ± 0,82
MTD176	90,0 <sup>ab</sup>	3,58 <sup>b</sup> ± 0,96	1,40 <sup>d</sup> ± 0,21	1,24 <sup>d</sup> ± 0,35

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ). Số liệu được trình bày theo dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.



**Hình 1.** Cụm chồi tạo thành từ đốt lá mầm của các giống đậu nành sau 28 ngày

Trong thí nghiệm này, số chồi tạo ra ở các giống thay đổi từ 2 đến 6 chồi, có thể phân thành 3 nhóm gồm HLDN29 (từ 5 chồi/mẫu); MTD176, DT22, DT84 (từ 3 chồi/mẫu) và 2 giống còn lại (ít hơn 3 chồi/mẫu) (Hình 1). Sau 4 tuần nuôi cây, khi hầu hết các mẫu giống đều không tạo thêm chồi thì HLDN29 tiếp tục tạo thêm chồi mới. Đây là giống đậu nành triển vọng trong nghiên cứu biến nạp gene. Từ đó, cho thấy khả năng tái sinh phụ thuộc rất nhiều vào kiểu gene.

#### Tạo cây hoàn chỉnh

Cụm chồi nhỏ được tách ra nuôi trên môi trường bổ sung IAA và GA<sub>3</sub> nhằm cảm ứng vươn chồi. Sau 28 ngày, ghi nhận có chồi vươn lên tách biệt với cụm chồi. Hai giống HL06 và HLDN29 có số chồi kéo dài khá cao > 3 chồi. Chồi của hai giống này phát triển khá đồng đều, lá xanh sẫm so với bốn giống còn lại.

**Bảng 2.** Khả năng vươn dài chồi của sáu giống đậu nành sau 28 ngày nuôi cấy

Giống	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ chồi
DT22	2,23 <sup>cd</sup> ± 0,21	4,37 <sup>ab</sup> ± 1,91	2,79 <sup>b</sup> ± 0,63
DT84	2,39 <sup>cd</sup> ± 0,16	4,20 <sup>ab</sup> ± 0,05	2,97 <sup>ab</sup> ± 0,16
HL06	3,95 <sup>a</sup> ± 0,37	3,41 <sup>ab</sup> ± 0,33	2,06 <sup>b</sup> ± 0,04
HL07-15	1,91 <sup>d</sup> ± 0,71	3,06 <sup>ab</sup> ± 0,16	2,09 <sup>b</sup> ± 0,02
HLDN29	3,58 <sup>ab</sup> ± 0,34	5,13 <sup>a</sup> ± 0,30	3,54 <sup>a</sup> ± 0,02
MTD176	2,97 <sup>ab</sup> ± 0,18	2,34 <sup>b</sup> ± 0,24	1,82 <sup>b</sup> ± 0,23

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,01$ ). Số liệu được trình bày theo dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.

Để tạo cây đậu nành hoàn chỉnh, các chồi của một số giống đậu nành được chuyển sang môi trường tạo rễ bổ sung 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA. Sau một tuần, chồi các giống đậu nành đều cảm ứng

tạo rễ tốt và đạt từ 5 rễ trở lên với chiều dài trung bình rễ từ 7 cm ở 3 tuần sau cấy (Bảng 3). Các cây con được thuần hoá với giá thể đất sạch và xơ dừa tỉ lệ 7:3, giữ ở nhiệt độ trung

ình 26°C, độ ẩm cao trong 14 ngày đầu, tưới trung bình 15 cm có từ 3 đến 4 lá thật, bắt đầu bổ sung dinh dưỡng (MS). Sau 4 tuần, cây cao ra hoa và tạo trái.

**Bảng 3.** Khả năng tạo rễ của chồi các giống đậu nành

Giống	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi
DT22	8,84 <sup>ab</sup> ± 0,96	9,19 <sup>abc</sup> ± 0,38	8,42 ± 0,57
DT84	6,77 <sup>bc</sup> ± 0,95	9,46 <sup>ab</sup> ± 0,25	9,12 ± 0,44
HL06	7,38 <sup>abc</sup> ± 1,24	7,67 <sup>d</sup> ± 0,23	6,63 ± 1,59
HL07-15	7,25 <sup>abc</sup> ± 0,35	7,94 <sup>cd</sup> ± 1,30	8,73 ± 1,45
HLDN29	5,74 <sup>c</sup> ± 0,34	10,1 <sup>a</sup> ± 0,08	8,98 ± 0,55
MTD176	9,88 <sup>a</sup> ± 2,30	8,43 <sup>bcd</sup> ± 0,34	8,34 ± 0,19

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ). Số liệu được trình bày theo dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.

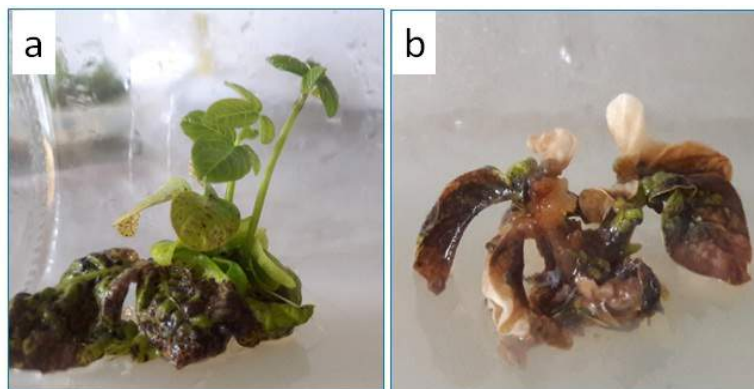
Khả năng tái sinh *in vitro* của 6 giống đậu nành thương mại có năng suất cao, ngắn ngày, thích ứng tốt với khí hậu miền Bắc (DT22, DT84), miền Đông Nam Bộ, Tây Nguyên (HL06, HL07-15, HLDN29) và Tây Nam Bộ (MTD176) đã được đánh giá. Trong đó, có thể phân chia thành 3 nhóm gồm HLDN29 (> 5 chồi/mẫu); MTD176, DT22, DT84 (> 3 chồi/mẫu) và 2 giống còn lại (< 3 chồi/mẫu). Sau 4 tuần nuôi cấy, trong khi hầu hết các mẫu giống đều không tạo thêm chồi thì HLDN29 lại tiếp tục tạo thêm chồi mới khỏe mạnh. Kết quả cho thấy thời gian tạo đa chồi 3 tuần là phù hợp đối với ba giống MTD176, DT22, DT84 sau đồng nuôi cấy với vi khuẩn.

Khi các cụm chồi nhỏ được nuôi trên môi trường cảm ứng vượn chồi bổ sung IAA và GA<sub>3</sub>, có thể nhận thấy sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng giúp các chồi vượn dài mà không tạo thêm chồi mới. Do thành phần và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng bổ sung

trong môi trường nuôi cấy là cố định, nên có thể cần phải nghiên cứu thêm để tìm nồng độ tối ưu. Các chồi được cảm ứng tạo rễ và thuần hóa ở điều kiện vườn ươm có số cây sống rất cao. Từ đó có thể đề xuất quy trình tái sinh cho từng giống đậu nành phục vụ tạo cây chuyển gene.

#### Nồng độ hygromycin tối thiểu dùng chọn lọc chồi chuyển gene

Chồi của 3 giống DT22, DT84 và MTD176 được cấy trên môi trường bổ sung hygromycin nhằm xác định nồng độ thích hợp để chọn chồi chuyển gene. Ở nồng độ 5 mg.L<sup>-1</sup>, sau 2 tuần 90% chồi có lá bị vàng, xuất hiện các đốm đen, mẫu phát triển chậm, có khoảng 15% mẫu chồi chết. Khi tăng nồng độ đến 10 mg.L<sup>-1</sup>, mẫu chồi bị vàng lá, xuất hiện đốm đen và chết hoàn toàn sau 4 tuần nuôi cấy (Hình 2). Như vậy, nồng độ hygromycin dùng để chọn lọc chồi chuyển gene là 10 mg.L<sup>-1</sup>, kết quả này tương tự với nghiên cứu của Olhoft và ctv (2003).



**Hình 2.** Chồi đậu nành trên môi trường bổ sung hygromycin sau 4 tuần nuôi cấy  
a) 5 mg.L<sup>-1</sup>; b) 10 mg.L<sup>-1</sup>

Năm 2001, Olhoft và ctv phát hiện rằng các hợp chất thiol làm tăng khả năng lây nhiễm khuẩn *Agrobacterium* ở đậu nành nhưng lại không phù hợp khi sử dụng glufosinate làm tác nhân chọn lọc. Để giải quyết vấn đề này, Olhoft và ctv đã phát triển hệ thống chọn lọc hygromycin phosphotransferase (HPTII) sử dụng hygromycin B như tác nhân chọn lọc. Điều này đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể hiệu quả chuyển gen, tăng gấp năm lần so với sử dụng glufosinate (Zeng và ctv, 2004). Trong nghiên cứu này hygromycin được sử dụng làm chất chọn lọc thể chuyển gene. Nồng độ chọn lọc sử dụng khác nhau tùy thuộc vào giống đậu nành. Các nghiên cứu trong nước cho thấy hygromycin 10 mg.L<sup>-1</sup> được sử dụng phổ biến (Trần Thị Cúc Hòa, 2008). Thí nghiệm đánh giá

hiệu quả chọn lọc trong nghiên cứu này cũng đã chỉ ra nồng độ này có hiệu quả để chọn lọc và đã được áp dụng chọn lọc chồi giả định chuyển gene đối với 3 giống đậu nành.

#### **Ảnh hưởng của lipoic acid đến khả năng tái sinh chồi sau lây nhiễm với vi khuẩn**

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, ở môi trường bổ sung lipoic acid tỉ lệ mẫu lá mầm cảm ứng tạo chồi đạt khoảng 70% so với 50% của đối chứng. Lá mầm phình to và xanh, cuống mầm không bị hoại tử. Sau 14 ngày nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo chồi và số chồi trung bình đều cao hơn so với đối chứng, trong đó giống DT22 cho hiệu quả tái sinh tốt nhất với 2,83 chồi/mẫu (Bảng 4). Các mẫu chồi sau 14 ngày được chuyển lên môi trường chọn lọc chứa 5 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin để bắt đầu chọn lọc chồi giả định chuyển gene.

**Bảng 4.** Kết quả tái sinh chồi của 3 giống đậu nành sau khi lây nhiễm với vi khuẩn

Giống	Số mẫu cảm ứng sau 3 ngày (%)		Số mẫu tạo chồi sau 14 ngày (%)		Số chồi/mẫu sau 14 ngày	
	(-) LA	(+) LA	(-) LA	(+) LA	(-) LA	(+) LA
DT22	54,3	84,7	46,8	59,3	2,11 ± 0,47	2,83 ± 0,47
DT84	47,8	70,7	33,6	39,3	1,34 ± 0,34	1,64 ± 0,28
MTD176	52,2	74,0	44,1	46,0	2,03 ± 0,36	2,54 ± 0,31

(-) LA: không bổ sung lipoic acid; (+) LA: bổ sung 0,12 mM lipoic acid. Số liệu được trình bày theo dạng trung bình hoặc trung bình ± độ lệch chuẩn.

#### **Chọn lọc chồi chuyển gene**

**Bảng 5.** Kết quả chọn lọc chồi giả định chuyển gene với hygromycin

Giống	+ 5 mg.L <sup>-1</sup> , 28 ngày				+ 10 mg.L <sup>-1</sup> , 14 ngày	
	Tỉ lệ mẫu sống (%)		Số chồi/mẫu		Tỉ lệ mẫu sống (%)	
	(-) LA	(+) LA	(-) LA	(+) LA	(-) LA	(+) LA
DT22	44,6	52,7	2,88 ± 0,23	3,15 ± 0,31	0	2,67 (4/150) *
DT84	10,5	14,0	1,09 ± 0,37	1,55 ± 0,18	0	0,00 (0/150)
MTD176	35,3	37,3	2,45 ± 0,29	2,80 ± 0,31	0	0,67 (1/150)

(-) LA: không bổ sung lipoic acid; (+) LA: bổ sung 0,12 mM lipoic acid. Số liệu được trình bày theo dạng trung bình hoặc trung bình ± độ lệch chuẩn. (\*) số chồi sống/tổng số mẫu cấy.

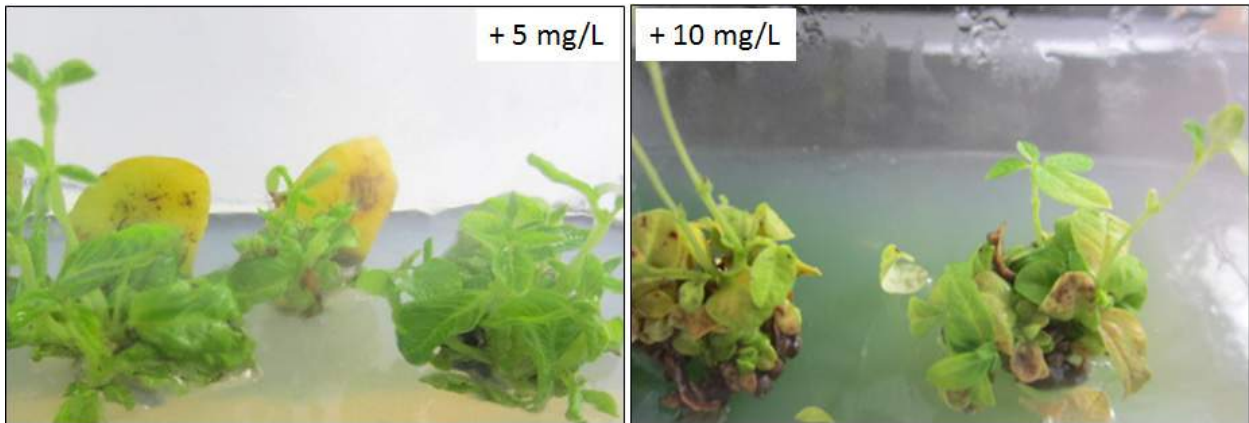
Sau 4 tuần trên môi trường chọn lọc có bổ sung 5 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin, tỉ lệ mẫu sống của giống DT84 khoảng 14%, mẫu bị hoá nâu ở vùng trụ mầm, mô phân sinh, một số mẫu bị vàng lá và chết. Trong khi đó, ở 2 giống còn lại cho thấy sự phát sinh chồi, tỉ lệ mẫu sống trên 50% và đạt 3 chồi/mẫu (giống DT22). Tuy các

mẫu chồi có xuất hiện đốm đen trên lá mầm và các chồi phát sinh nhưng không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của mẫu.

Khi tiếp tục nuôi trên môi trường bổ sung 10 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin hầu hết chồi nhanh bị ức chế sinh trưởng, vàng lá và chết sau 14 ngày. Kết quả thu nhận được 4 mẫu chồi DT22 (2,67%)

và 1 mẫu chồi MTD176 (0,67%) còn sống sau 14 ngày. Đây là những chồi hình thành từ đốt

lá mầm đồng nuôi cấy với vi khuẩn trong môi trường có bổ sung lipoic acid.

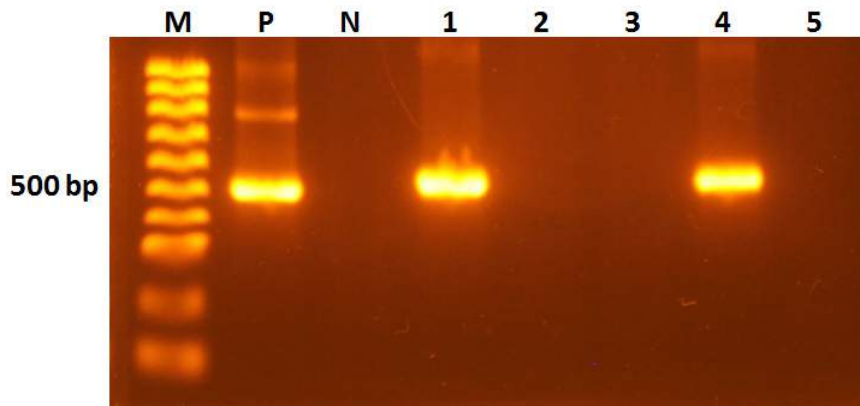


**Hình 3.** Chồi đậu nành giả định chuyển gene trên môi trường chứa hygromycin  
Bên trái: 5 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin, 4 tuần; Bên phải: 10 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin, 2 tuần.

#### Phân tích mẫu chồi giả định chuyển gene

Những chồi sống trên môi trường chứa 10 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin sau 14 ngày được chuyển sang nuôi trên môi trường cảm ứng vượn chồi.

Đồng thời DNA tổng số từ chồi cũng được tách chiết để xác định thể chuyển gene thông qua sự hiện diện của gene *hptII*.



**Hình 4.** Kết quả điện di khuếch đại gene *hptII* ở các mẫu chồi giả định chuyển gene

*L*: thang DNA chuẩn 100 bp; *P*: plasmid pSM103; *N*: chồi đối chứng; 1, 2, 3, 4: chồi giả định chuyển gene giống DT22; 5: chồi giả định chuyển gene giống MTD176.

Kết quả cho thấy ở chồi số 1 và số 4 của giống DT22 có xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với kích thước đoạn gene *hptII* là 508 bp. Trong khi đó chồi số 2 và số 3 (DT22), số 5 (MTD176) và đối chứng âm N (cây không lây nhiễm) đều có kết quả âm tính. Do đó, có thể khẳng định bước đầu đã thu nhận được chồi chuyển gene T0. Các chồi được tiếp tục nuôi tạo rễ hoàn chỉnh và thuần hóa nhằm thu nhận được cây T1 cho các phân tích tiếp theo.

Khả năng chuyển DNA liên quan chặt chẽ với các chủng vi khuẩn *Agrobacterium*, mật độ vi khuẩn, thời gian lây nhiễm và điều kiện đồng nuôi cấy (Cheng và ctv, 2011). Các yếu tố này đã được tối ưu hóa nhờ bổ sung chất hoạt động bề mặt (Silwet L-77) trong dịch vi khuẩn, cũng như duy trì nhiệt độ nuôi cấy và pH môi trường dinh dưỡng (Dang và Wei 2007; Liu và ctv, 2008). Một vấn đề quan trọng trong chuyển gene là sự hoại tử của mẫu, có thể liên quan đến các chất hoạt động chứa oxy (ROS) làm hư hại tế bào hoặc kích hoạt, thay đổi các quá trình trao

đổi chất. Sự hoạt động của enzyme peroxidase ở mức độ cao và quá trình oxy hóa tiếp theo trong quá trình tương tác giữa *A. tumefaciens* và tế bào thực vật có thể gây ra hoại tử mô và chết tế bào (Dan và ctv, 2009). Việc bổ sung các chất chống oxy hoá vào môi trường nuôi cấy hoặc trước khi lây nhiễm đã chứng minh làm giảm sự hoại tử mô cây. Bổ sung cysteine, dithiothreitol và các hợp chất thiol trong môi trường đồng nuôi cấy cũng làm giảm hoại tử mẫu và tăng cường hiệu quả chuyển gene (Olhoft và Somers, 2001; Olhoft và ctv, 2003).

Lipoic acid là một hợp chất chứa lưu huỳnh liên quan đến một số phức hợp enzyme như pyruvate dehydrogenase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase, keto acid dehydrogenase và glycine decarboxylase (Dan và ctv, 2009). Bổ sung 25 mg.L<sup>-1</sup> lipoic acid vào môi trường đồng nuôi cấy đã tăng đáng kể hiệu quả chuyển gene đậu nành từ 0,6 đến 3,7% (Dan và ctv, 2009). Trong nghiên cứu này, việc bổ sung thêm 0,12 mM alpha lipoic acid đã giúp giảm bớt sự hóa nâu vàng và hoại tử của mẫu dẫn đến tạo chồi chuyển gene thành công.

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, khả năng tái sinh của 6 giống đậu nành đã được đánh giá và chọn giống đậu nành thích hợp để thử nghiệm chuyển gene. Nồng độ hygromycin 10 mg.L<sup>-1</sup> là thích hợp sử dụng để chọn lọc chồi đậu nành giả định chuyển gene. Thêm vào đó đã chứng minh lipoic acid giúp tăng số mẫu tạo chồi sau lây nhiễm vi khuẩn và nâng hiệu quả chuyển gene đạt khoảng 1%. Những kết quả này có thể ứng dụng trong chuyển gene nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* trên cây đậu nành.

## LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn TS. Nguyễn Hữu Hồ, TS. Phan Tường Lộc, Viện Sinh học Nhiệt đới đã đóng góp ý kiến quý báu trong chuyển gene đậu nành. Cảm ơn sinh viên Phan Thị Mai Thi, Lê Thị Ngọc Anh đã tham gia thực hiện các công việc nghiên cứu. Cảm ơn TS. Trần Thị Trường, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ đã cung cấp hạt giống đậu nành. Nghiên cứu này thuộc đề tài mã số B2015-12-14 được tài trợ kinh phí bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chaudhry A. (1985). Constraints of provinces expanding area under non-conventional oil seeds. *Proceedings of national seminar on oil seed research and development in Pakistan head in Islamabad* on May 7-9, 29-37.
- Cheng M., Chang Y.F., Olhoft P.M., Cardoza V., Lai F.M., Jones T.D., Wenck A.R. (2011). Cells/Tissues conditioning for facilitating T-DNA delivery. In: Dan Y.H., David W.O. (ed.): *Plant Transformation Technology Revolution in Last Three Decades, Historical Technology Development in Plant transformation*. Bentham Science Publishers, USA, 77-107.
- Dan Y.H., Armstrong C.L., Jimmy D., Feng X.R., Joyce E.F., Keithly G.E. (2009). Lipoic acid – a unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant* 45: 630–638.
- Dang W., Wei Z.M. (2007). An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science* 173(4): 381–389.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151.
- Khan A.Z., Shah P., Lhalil S.K. and Ahmad B. (2004). Yield of soybean cultivars as affected by planting date under Peshawar valley conditions. *The Nucleus* 41(1-4): 93-95.
- Liu S.J., Wei Z.M., Huang J.Q. (2008). The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Reports* 27(3): 489-498.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Olhoft P.M., Somers D.A. (2001). L - Cysteine increases *Agrobacterium* mediated T - DNA delivery into soybean cotyledonary node cells. *Plant Cell Reports* 20(8): 706-711.



- Olhofs P.M., Fligel L.E., Donovan C.M., Somers D.A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method. *Planta* 216(5): 723-735.
- Paz M.M., Shou H., Guo Z., Zhang Z., Banerjee A.K., Wang K. (2004). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136(2): 167-179.
- Trần Thị Cúc Hoà (2008). Tối ưu hóa quy trình chuyển nạp gen đậu tương bằng cải tiến phương pháp lây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 9: 8-11.
- Zeng P., Vadnais D. A., Zhang Z., Polacco J. C. (2004). Refined glufosinate selection in *Agrobacterium* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports* 22(7): 478-482.