

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GENE Mẫn CẢM AUXIN (*INO-rolB*) VÀO GIỐNG QUÍT ĐƯỜNG CANH VÀ CAM VINH

Phan Hữu Tôn^{1,2*}, Tống Văn Hải^{1,2}, Đoàn Văn Lưu³, Nguyễn Đức Bách^{1,2} và Abhaya Dandenkar⁴

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

² Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

³ Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

⁴ Đại học California UC David, USA

Email*: phanhuuton@yahoo.com

Ngày gửi bài: 11.07.2013

Ngày chấp nhận: 28.09.2013

TÓM TẮT

Hiện tượng vô phôi ở cây cam quýt thường cho quả không hạt, kích thước nhỏ và chất lượng kém. Nguyên nhân là do không có sự phát triển của phôi nên bầu nhụy không tổng hợp được auxin hoặc nồng độ auxin quá thấp không đủ kích thích được quả phát triển bình thường. Trong số các biện pháp tạo giống cam quýt không hạt như lai xa, tạo dòng tam bội, tạo đột biến, việc chuyển gene mẫn cảm auxin hoạt động đặc thù bầu nhụy đã mở ra hướng mới trong tạo giống cam quýt không hạt. Trong nghiên cứu này, vector pDU04.4522 mang gene mẫn cảm auxin (*INO-rolB*) chịu sự kiểm soát của promoter đặc thù bầu nhụy (*INO*) được chuyển vào trụ trên lá mầm các giống quýt Đường Canh và cam Vinh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng C58. Nhằm xác định điều kiện tối ưu cho việc chuyển gene *INO-rolB* vào hai giống quýt Đường Canh và cam Vinh 4 thí nghiệm đã được tiến hành tập trung vào giai đoạn đồng nuôi cấy. Kết quả đã chuyển thành công gen mẫn cảm auxin (*INO-rolB*) vào giống quýt Đường Canh và cam Vinh thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58. Hiệu quả chuyển gene đạt cao nhất ở giai đoạn đồng nuôi cấy, trong môi trường bổ sung 50 – 100 μ M acetosyringone và 2 mg/l NAA ở 22°C trong 3 ngày.

Từ khóa: Acetosyringone, chuyển gene, cam quýt vô phôi, vi khuẩn *A. tumefaciens*, *INO-rolB* gen.

Study on The Transfer of Auxin Susceptible Gene (*Ino-Rolb*) into Duong Canh Mandarin and Vinh Orange

ABSTRACT

The apomixis phenomenon in citrus often leads to small, seedless and poor quality fruits. It is due to no or very less auxin is synthesized in the ovary leading to the abnormal development of embryo. Therefore, the fruits can not develop normally. Of many different strategies for seedless breeding in citrus such as outcrossing, triploidy, mutagenesis, the transfer of auxin-sensitive gene particularly expressed in ovary is a very useful approach. In this study, the vector pDU04.4522 carrying the auxin-sensitive gene (*INO-rolB*) working under the control of *INO* promoter was transferred into Duong Canh mandarine and Vinh orange. In order to identify the optimal conditions for gene transfer, four experiments focusing on the co-culture stage were carried out. Results showed that the auxin-sensitive gene *INO-rolB* was successfully transferred into the cotyledon of Duong Canh tangerine and Vinh orange. The optimal conditions for high efficiency of gene transfer in co-culture medium were at 22°C for 3 days in the presence of 50 - 100 μ M acetosyringone and 2 mg/l NAA.

Keywords: Acetosyringone, *Agrobacterium tumefaciens*, auxin-sensitive gene (*INO-rolB*), co-culture, gene transformation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam quýt là cây ăn quả có múi quan trọng ở nước ta. Tuy nhiên, nhiều giống cam quýt đang trồng đều có nhiều hạt. Điều này đã làm giảm chất lượng, giá trị thương phẩm khi ăn tươi, chế biến hay xuất khẩu, đặc biệt sang các thị trường khó tính như Mỹ, Nhật Bản và các nước châu Âu. Vì thế, việc chọn tạo ra các giống cam quýt không hạt là nhu cầu cấp thiết hiện nay.

Để tạo giống cam quýt không hạt, người ta sử dụng nhiều biện pháp như: lai xa, xử lý đột biến tạo dòng đa bội bằng colchicine, lai cây tứ bội với cây lưỡng bội để tạo cây tam bội, nuôi cấy tế bào nội nhũ để tạo cây tam bội. Tuy nhiên, các phương pháp trên thường tốn nhiều thời gian, thiếu tính định hướng nên kết quả chọn lọc thấp và không ổn định.

Nghiên cứu của Nitsch (1970), Monselise (1979), Wilson (1983), Hedden (1997), Rotino (1997), Donzella (2000) thấy rằng: ở nhiều loài cây vô phôi việc tổng hợp auxin trong bầu nhụy xảy ra ở giai đoạn sớm, với lượng đủ lớn, có thể kích thích được quả phát triển mà không cần thụ phấn nên đã tạo ra quả không hạt. Điều này đã mở ra một hướng mới trong chiến lược tạo quả không hạt ở giống cây cam quýt vô phôi, bằng cách chuyển gen mã mã auxin có promoter hoạt động đặc thù bầu nhụy vào cây vô phôi sẽ giúp quả không cần thụ tinh, không sinh auxin nhưng vẫn có khả năng thu hút một lượng auxin nhỏ vào bầu nhụy và kích thích bầu nhụy phát triển và tạo quả không hạt. Hướng nghiên cứu này đã thành công trên nhiều đối tượng như cà, cà chua, dâu tây, dưa hấu và một số giống cây ăn quả có múi vô phôi khác.

Gen mã mã auxin *rolB* được tách từ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* (Carmi et al. 2003), và được gắn với promoter hoạt động đặc thù bầu nhụy tách từ cây *Arabidopsis thaliana* (INO), tạo ra tổ hợp gen *INO-rolB* mã mã auxin. Tổ hợp gen này mã hóa một protein, khi kết hợp với một lượng auxin nhỏ từ đầu đó ở trong cây là có thể kích thích quá trình phân chia bầu nhụy, để tạo quả mà không cần thụ phấn thụ tinh và tạo hạt. Hiện tổ hợp gen *INO-rolB* đã được gắn vào vectơ pDU04.4522 có kích

thước 20681bp và toàn bộ hệ gen trên được chuyển vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng C58 phục vụ cho chuyển gen (Carmi et al. 2003).

Giống quýt Đường Canh và Cam Vinh là hai giống thích ứng rộng, được trồng phổ biến ở nhiều nơi, nhưng có nhiều hạt tùy theo năm. Đặc biệt giống quýt Đường Canh có biểu hiện hiện tượng vô phôi, cho quả không hạt, nhưng quả lại hay rụng, bé và méo mó làm giảm chất lượng và năng suất. Điều này có thể có liên quan đến khả năng sinh và cung cấp auxin, ảnh hưởng đến quá trình phân chia tế bào bầu nhụy và phát triển thành quả. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu các yếu tố ở giai đoạn đồng nuôi cấy, ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen mã mã auxin *INO-rolB*, thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vào giống quýt Đường Canh và cam Vinh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Phần trụ trên lá mầm (1cm) của hai giống cam Vinh và quýt Đường Canh; chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 chứa vectơ pDU04.4522, có kích thước 20681bp mang gen mục tiêu *rolB*, promoter *INO* hoạt động đặc thù bầu nhụy và gen chỉ thị là *GUS*. Plasmid pDU04.4522 mang gen kháng kanamycine và gentamycine.



Hình 1. Véc tơ pDU04.4522 mã mã auxin (INO-rolB)

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo dịch huyền phù vi khuẩn

Nuôi vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng C58 chứa vectơ mang gen trên môi trường LB đặc (10 g/l yeast extract + 5 g/l NaCl + 10 g/l pepton + 15 g/l agar), pH = 7, bổ sung

50 mg/l gentamycine và đặt vi khuẩn trong điều kiện tối, ở 27°C. Sau 48 giờ cấy chuyển vi khuẩn sang môi trường LB lỏng, bổ sung 50 mg/l gentamycine và đặt ở nhiệt độ 27°C trong 24h, liên tục lắc với tốc độ 180 vòng/phút. Thu dịch nuôi và ly tâm 6000 vòng/phút để thu sinh khối vi khuẩn. Pha loãng vi khuẩn bằng môi trường MS + 3% sucrose, pH = 5.8 cho đến khi chỉ số OD₆₀₀ = 0,7. Đây là dịch huyền phù vi khuẩn sử dụng để lây nhiễm trong các thí nghiệm.

2.2.2. Cảm ứng mẫu, lây nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy

Dung dịch cảm ứng mẫu có áp suất thẩm thấu cao là MS + 8% sucrose, pH = 5.8;

300 mẫu trụ trên lá mầm được ngâm vào 200 ml dung dịch cảm ứng mẫu trong 30 phút trước khi nhiễm khuẩn giúp tăng hiệu quả biến nạp. Sau đó nhúng ngập trong 200ml dịch huyền phù vi khuẩn trong 20 phút, thấm khô rồi cấy lên môi trường đồng nuôi cấy.

2.2.3. Phương pháp rửa khuẩn và tái sinh chồi

Sau đồng nuôi cấy, các đoạn trụ trên lá mầm được rửa khuẩn bốn lần (2 lần bằng nước cất vô trùng và 2 lần bằng dung dịch có chứa kháng sinh cefotaxime 500 mg/l). Mẫu được thấm khô và cấy trên môi trường tái sinh chồi MS + 1 mg/l BA + 400 mg/l cefotaxim.

2.2.4. Chọn lọc chồi chuyển gen

Các chồi được tách ra rồi đưa vào nuôi cấy trong môi trường chọn lọc chồi chuyển gen chứa: MS + 1mg/l BA + 50 mg/l kanamycine, pH = 5.8. Sau 2 tháng, chồi nào có đoạn gen chuyển vào chứa gen kháng kanamycine thì vẫn tiếp tục sống, còn các chồi khác sẽ có hiện tượng chuyển màu dần từ xanh sang vàng và cuối cùng bị chết.

2.2.5. Kiểm tra sự có mặt của gen GUS

Cắt mỗi chồi còn sống một lá, sau đó đem ngâm ủ trong dung dịch đệm có chứa X-Gluc, đặt trong tủ ổn nhiệt ở 37°C. Sau 48 giờ ủ, đem mẫu ra ngâm vào dung dịch cồn 70% để phá hủy diệp lục (rửa 2-3 lần, mỗi lần cách nhau 3-5h), rồi tiến hành quan sát và chụp ảnh. Những lá hay chồi nào không nhận được gen biến nạp thì không có

màu xanh (GUS⁻). Những mẫu nào có màu xanh lam đặc trưng (GUS⁺) là cây có thể đã nhận được gen đích *INO-rolB*. Những cây có biểu hiện gen GUS⁺ sẽ được cấy chuyển sang môi trường kéo dài chồi.

2.2.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen

Mẫu trụ trên lá mầm sau khi nhiễm khuẩn nồng độ OD₆₀₀ = 0,7 trong 20 phút được nuôi trong môi trường MS + 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA + 100μM acetosyringone (AS) + 3% sucrose + 0,8% agar, pH = 5.8, với thời gian 3 ngày ở 4 mức nhiệt độ khác nhau (19°C, 22°C, 25°C và 28°C).

2.2.7. Ảnh hưởng của acetosyringone (AS) trong môi trường đồng nuôi cấy

Trụ trên lá mầm được lây nhiễm tương tự như trên sau đó được cấy trên môi trường đồng nuôi cấy có bổ sung AS theo các nồng độ (0, 50μM, 100μM, 150μM và 200μM), trên môi trường đồng nuôi cấy là MS + 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA + 3% sucrose + 0,8% agar, pH = 5.8, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, nhiệt độ đồng nuôi cấy 22°C.

2.2.8. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy

Tiến hành đồng nuôi cấy theo ba mức thời gian khác nhau (2, 3 và 4 ngày). Môi trường đồng nuôi cấy là MS + 1 mg/l BA + 2mg/l NAA + 3% sucrose + 0,8% agar bổ sung 50 -100μM AS, pH = 5.8, nhiệt độ đồng nuôi cấy 22°C.

2.2.9. Ảnh hưởng của auxin trong môi trường đồng nuôi cấy

Tiến hành đồng nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA theo các nồng độ 0, 1, 2, 3 và 4 mg/l. Môi trường đồng nuôi cấy nền là MS + 1 mg/l BA + 3% sucrose + 0,8% agar, bổ sung 50-100μM AS, pH = 5.8, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày, nhiệt độ đồng nuôi cấy 22°C.

2.2.10. Bố trí thí nghiệm và các chỉ tiêu theo dõi

Mỗi công thức thí nghiệm bố trí 100 mẫu/lần với 3 lần nhắc lại. Ba giai đoạn quan trọng được theo dõi trong nghiên cứu này là giai

đoạn đồng nuôi cấy, tái sinh chồi và nuôi trên môi trường chọn lọc. Trong giai đoạn đồng nuôi cấy, tỷ lệ khuẩn lạc phủ kín mẫu được đánh giá theo phần trăm (%). Ở giai đoạn tái sinh chồi, tỷ lệ mẫu bị tái nhiễm khuẩn, tỷ lệ mẫu tái sinh. Trên môi trường chọn lọc, sự biểu hiện của gen GUS ở mô được chuyển tại giai đoạn nuôi cấy được phát hiện bằng cách nhuộm với X-Gluc. Tỷ lệ mẫu chuyển gene thành công được tính bằng tỷ lệ chồi còn sống (số chồi sống/ số chồi cấy)/ tỷ lệ chồi có biểu hiện gen GUS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen INO-rolB

Giai đoạn đồng nuôi cấy là thời gian xảy ra nhiều quá trình quan trọng như vi khuẩn *A. tumefaciens* tiếp xúc với tế bào mẫu nuôi cấy, kích thích tế bào bị thương sinh ra các hợp chất phenol, hoạt động của nhiều enzyme giúp quá trình cắt gen chuyển tạo sợi đơn, bọc bảo vệ và đưa gen chuyển vào tế bào cây, cởi áo protein bọc, tái bản tạo sợi DNA chuyển DNA kép, rồi nhập vào DNA nhiễm sắc thể tế bào cây chủ. Các quá trình trên phụ thuộc vào nhiều yếu tố môi trường.

Nhiệt độ đồng nuôi cấy là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của nhiều enzyme, protein, sự phát triển của vi khuẩn, khả năng tái sinh của mẫu cấy và hiệu quả biến nạp gen (Almeida et al., 2003). Tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu đối với mỗi gen chuyển, chủng vi khuẩn, mẫu cấy giống và loài cây chuyển gen lại rất khác nhau. Ở nghiên cứu này, các mẫu sau khi nhiễm

khuẩn được tiến hành đồng nuôi cấy với các nhiệt độ khác nhau (19°C, 22°C, 25°C, 28°C). Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển mẫu sang môi trường tái sinh chồi (kéo dài 2,5 tháng), tiếp đó chuyển sang môi trường chọn lọc (kéo dài 2 tháng). Tỷ lệ khuẩn lạc phát triển phủ kín mẫu, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi, tỷ lệ mẫu chồi còn sống trên môi trường chọn lọc được xác định (Bảng 1).

Từ kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy, nhiệt độ đồng nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của vi khuẩn, khả năng tái sinh của mẫu và tỷ lệ chồi tái sinh còn sống sót trên môi trường chọn lọc. Khi đồng nuôi cấy ở nhiệt độ cao 28°C vi khuẩn phát triển mạnh, nhiều mẫu bị vi khuẩn phủ kín. Chính vì vậy tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp, 10% đối với quýt Đường Canh và 12,0% đối với Cam Vinh. Ở ngưỡng nhiệt độ này tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc cũng thấp. Sự phát triển quá mạnh của vi khuẩn còn gây khó khăn cho quá trình rửa và diệt khuẩn, làm tăng hiện tượng mẫu bị tái nhiễm khuẩn và làm cho tỷ lệ mẫu bị mất khả năng tái sinh chồi tăng lên. Theo Almeida et al. (2003), nhiệt độ cao trên 29°C ảnh hưởng đến quá trình chuyển đoạn T-DNA từ *Agrobacterium* vào bộ gen của tế bào thực vật. Hệ thống protein vir, đặc biệt là protein virA rất mẫn cảm với nhiệt độ cao, chúng bị bất hoạt ở 29°C và biến tính ở 32°C. Điều này giải thích tại sao bệnh do khối u bệnh khối u do *Agrobacterium* thường không xuất hiện vào mùa hè

Đồng nuôi cấy ở 25°C tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao hơn, 32,6% với quýt Đường Canh và 34,0% đối với cam Vinh. Chồi sống sót trên môi trường chọn lọc cũng đạt 6,0% đối với quýt Đường Canh

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đồng nuôi cấy đến khả năng chuyển gen

Giống	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ khuẩn lạc phủ kín mẫu (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc (%)
Quýt Đường Canh	19	0,0	70,0	3,3
	22	0,0	60,0	17,0
	25	4,0	32,6	6,0
	28	6,6	10,0	3,6
Cam Vinh	19	0,0	68,3	3,0
	22	0,0	64,0	17,3
	25	3,6	34,0	6,6
	28	7,6	12,0	4,6

và 6,6% đối với cam Vinh. Đồng nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu tái sinh và mẫu chồi sống sót trên môi trường chọn lọc cao nhất ở 22°C. Tỷ lệ chồi tái sinh và sống sót là 60,0% và 17,0% đối với quýt Đường Canh; 64,0% và 17,3% đối với đối với Cam Vinh. Ở nhiệt độ 22°C vi khuẩn phát triển ở mức vừa phải, không xuất hiện những khuẩn lạc phát triển phủ kín mẫu, mật độ vi khuẩn vừa đủ để thực hiện quá trình chuyển gen và ít ảnh hưởng đến sức sống và khả năng tái sinh của mẫu. Theo Almeida et al. (2003) thì nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính của protein virA là 22°C - 23°C. Kết quả này tương tự với những kết quả của nhóm tác giả trên đối tượng *Citrus sinensis* và *Citrus limonia* hay của Ghorbel (2000). Ở 19°C vi khuẩn phát triển kém, vi khuẩn bao quanh mẫu ít, chính vì vậy tỷ lệ mẫu tái sinh rất cao nhưng tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc thấp nhất do vi khuẩn hoạt động yếu và đoạn T-DNA không được chuyển vào.

Như vậy đồng nuôi cấy ở 22°C là điều kiện thích hợp, khả năng tái sinh chồi cao và tỷ lệ mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc là cao nhất. Do đó 22°C là nhiệt độ đồng nuôi cấy thích hợp nhất cho hoạt động chuyển gen miễn cảm với auxin vào trụ trên lá mầm cây quýt Đường Canh và cam Vinh thông qua *A. tumefaciens*. Đồng nuôi cấy ở 22°C được lựa chọn trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của acetosyringone trong môi trường đồng nuôi cấy đến hiệu quả biến nạp gen

Khi nghiên cứu quá trình chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, người ta thấy rằng khi cây bị thương thường tiết ra một số hợp chất phenolic như acetosyringone (AS) và hydroxyacetosyringone (OH-AS). Các chất này có tác dụng làm lành vết thương, nhưng đồng thời cũng thu hút vi khuẩn *Agrobacterium* tập trung quanh vùng vết thương và hoạt hóa hệ thống gen vir trên Ti-plasmid. Do đó AS là chất không thể thiếu đối với hoạt động biến nạp gen của vi khuẩn *Agrobacterium* (Henzi et al., 2000). Để nâng cao hiệu quả chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, người ta thường bổ sung AS vào dung dịch pha loãng vi khuẩn và môi trường

đồng nuôi cấy. Tuy nhiên, phản ứng với AS còn phụ thuộc vào từng giống cam quýt. Trong nghiên cứu này, AS được bổ sung vào dung dịch pha loãng vi khuẩn và môi trường đồng nuôi cấy theo các nồng độ khác nhau (không bổ sung, 50µM, 100µM, 150µM và 200µM). Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, ở 22°C, cây chuyển mẫu sang môi trường tái sinh chồi, tiếp đó cây chuyển sang môi trường chọn lọc. Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi, tỷ lệ mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc được trình bày ở bảng 2.

Như vậy, việc bổ sung acetosyringone vào môi trường đồng nuôi cấy là cần thiết và có tác dụng làm tăng hiệu quả biến nạp gen. Tỷ lệ chồi sống sót trên môi trường chọn lọc ở công thức bổ sung 50µM và 100µM đạt hiệu quả cao nhất trên cả 2 giống quýt Đường Canh và Cam Vinh. Tỷ lệ chồi sống sót khi bổ sung 50µM là 18,3% đối quýt Đường Canh và 16,3% đối với cam Vinh. Bổ sung 100 µM cũng cho kết quả tương tự lần lượt 18,6% trên giống quýt đường Canh và 16,6% trên giống Cam Vinh, cao hơn hẳn so với công thức không bổ sung AS. Điều này có thể giải thích bởi lượng acetosyringone do đoạn epicotyl của giống quýt Đường Canh và Cam Vinh tiết ra chưa đủ lớn để đạt đến ngưỡng cực thuận cho quá trình hoạt hóa hệ thống protein vir, nên khi ta bổ sung thêm AS vào môi trường đồng nuôi cấy đã có tác dụng tăng hiệu quả biến nạp gen. Khi tăng nồng độ AS lên 150 và 200µM, tỷ lệ chồi sống sót trên môi trường chọn lọc giảm so với bổ sung 50 hay 100µM trên cả 2 giống thí nghiệm. Điều này có thể lý giải do nồng độ 150 và 200µM AS có thể vượt quá ngưỡng cực thuận gây ra sự ức chế làm giảm hiệu quả chuyển gen. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Cervera (1998) trên giống cam ngọt Pineapple, Luth and Moore (1999) với giống bưởi Duncan and Dutt (2009) với giống cam Carrio. Tuy nhiên, nồng độ 200µM AS cực thuận đối với giống cam ngọt Washington nevel (Bond, 1998). Ở giống Carrizo citrange khi không bổ sung AS lại có kết quả cao hơn khi bổ sung 50, 100, 150µM AS hoặc 200µM AS (Pena, 1995), do các giống cam này đã tiết đủ lượng AS cần thiết.

Như vậy, việc bổ sung 50 và 100µM acetosyringone vào môi trường đồng nuôi cấy đã

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc bổ sung acetosyringone (AS) vào môi trường đồng nuôi cấy đến tỷ lệ tái sinh chồi và tỷ lệ sống sót của mẫu trên môi trường chọn lọc chứa kháng sinh kanamycine

Giống	Nồng độ AS (μ M)	Tỷ lệ chồi tái sinh %	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc %	Giống	Nồng độ AS (μ M)	Tỷ lệ chồi tái sinh %	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc %
Quýt Đường Canh	0	64,6	8,6	Cam Vinh	0	64,7	6,0
	50	71,3	18,3		50	68,0	16,3
	100	70,0	18,6		100	66,3	16,6
	150	67,3	16,0		150	62,3	14,6
	200	66,6	14,6		200	49,6	13,0

thu được tỉ lệ mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc cao nhất đối với cả quýt Đường Canh và cam Vinh. Do đó, việc bổ sung 50 - 100 μ M AS vào môi trường đồng nuôi cấy là nồng độ AS thích hợp nhất cho hoạt động biến nạp gen *INO-rolB* vào đoạn trụ trên lá mầm của giống quýt Đường canh và Cam Vinh thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Bổ sung 50 - 100 μ M AS vào môi trường đồng nuôi cấy được lựa chọn trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen *INO-rolB*

Thời gian đồng nuôi cấy là một trong những yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả biến nạp gen, vì nó có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn và khả năng tái sinh của mẫu. Do đó, phải tìm ra được thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho từng giống cam, quýt. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành đồng nuôi cấy theo ba mức thời gian khác nhau (2 ngày, 3 ngày và 4 ngày). Môi trường đồng nuôi cấy là môi trường tốt nhất đã được xác định: MS + 50 μ M AS + 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA, ở 22°C. Sau thời gian đồng nuôi cấy, rửa khuẩn và cấy chuyển mẫu sang môi trường tái sinh chồi, rồi môi trường chọn lọc. Kết quả theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc, tỉ lệ mẫu tái sinh chồi, tỉ lệ mẫu chồi còn sống trên môi trường chọn lọc. Kết quả được tổng hợp ở bảng 3.

Khi tăng thời gian đồng nuôi cấy từ 2 ngày lên 4 ngày đã làm tăng sự phát triển của khuẩn lạc, nhưng lại làm giảm sức sống và khả năng tái sinh chồi của mẫu, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen (Bảng 3). Đồng nuôi

cấy 2 ngày có ưu điểm là tỉ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất 73,3% (đối với quýt Đường Canh) và 68,8% (đối với Cam Vinh). Nhưng tỉ lệ chồi còn sống trên môi trường chọn lọc lại thấp 11,6% (đối với quýt Đường Canh) 9,6% (đối với Cam Vinh). Nguyên nhân của hiện tượng này là do thời gian đồng nuôi cấy quá ngắn, nên số lượng vi khuẩn được sinh ra chưa đủ lớn để có thể ảnh hưởng đến sức sống và khả năng tái sinh chồi của mẫu. Đồng thời, mật độ vi khuẩn cũng chưa đạt đến giá trị cực thuận cho hoạt động chuyển gen. Đồng nuôi cấy trong 4 ngày có tỉ lệ mẫu tái sinh chồi và tỉ lệ chồi còn sống trên môi trường chọn lọc thấp nhất lần lượt 38,3% và 12,0% (đối với quýt Đường Canh) và 30,3% và 10,3% (đối với Cam Vinh). Do thời gian đồng nuôi cấy quá dài vi khuẩn phát triển quá mạnh, nên đã làm xuất hiện một số mẫu bị vi khuẩn phủ kín mẫu. Sự phát triển quá mạnh của vi khuẩn như vậy, đã làm giảm sức sống và khả năng tái sinh của mẫu, thậm chí còn làm chết một số mẫu ngay sau giai đoạn đồng nuôi cấy. Ngoài ra nó còn gây khó khăn cho quá trình rửa và diệt khuẩn, dẫn đến tăng hiện tượng mẫu bị tái nhiễm khuẩn nhiều lần và khi đó tỉ lệ mẫu tái sinh thấp.

Hiệu quả chuyển gen đạt cao nhất khi đồng nuôi cấy trong 3 ngày, tỉ lệ số mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc là 18,6% (đối với quýt Đường Canh) và 17,6% (đối với Cam Vinh). Thời gian 3 ngày là vừa đủ để vi khuẩn phát triển đạt đến ngưỡng cực thuận cho hoạt động biến nạp gen, nhưng vẫn chưa quá lớn để có thể ảnh hưởng xấu đến khả năng tái sinh chồi của mẫu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến sự phát triển của khuẩn lạc, khả năng tái sinh chồi và sống của chồi trên môi trường chọn lọc chồi

Giống	Thời gian (ngày)	Sự phát triển của vi khuẩn	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc (%)
Quýt Đường Canh	2	+	73,3	11,6
	3	++	65,6	18,6
	4	+++	38,3	12,0
Cam Vinh	2	+	68,6	9,6
	3	++	62,6	17,6
	4	+++	30,3	10,3

Chú thích: (+) Khuẩn lạc phát triển yếu, hình thành một lớp màng rất mỏng bao quanh mẫu.

(++) Khuẩn lạc phát triển ở mức vừa phải, tạo thành lớp màng mỏng bao quanh mẫu

(+++)

Như vậy, đồng nuôi cấy trong thời gian 3 ngày thu được tỷ lệ mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc là cao nhất. Do đó, đồng nuôi cấy trong 3 ngày là khoảng thời gian thích hợp nhất cho hoạt động biến nạp gen miễn cảm auxin vào trụ trên lá mầm giống quýt Đường Canh và cam Vinh thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Đồng nuôi cấy trong 3 ngày được lựa chọn trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng của việc bổ sung auxin vào môi trường đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen

Quá trình chuyển đoạn T-DNA đạt hiệu quả cao khi đối tượng là các mô tế bào đang phân chia, đặc biệt ở pha S. Nồng độ auxin trong môi trường đồng nuôi cấy có tác dụng kích thích tăng tỷ lệ tế bào đang ở pha S, từ đó gia tăng tần số biến nạp gen (Pena et al., 2004). Tuy nhiên, mỗi giống cam quýt lại có mức độ miễn cảm đối với nồng độ auxin khác nhau. Do đó trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành đồng nuôi cấy bổ sung NAA theo các nồng độ khác nhau (0, 1, 2, 3 và 4 mg/l). Môi trường nên là môi trường tốt nhất đã được xác định là MS + 1 mg/l BA + 50 μ M AS + 3% sucrose + 0,8% agar, pH = 5.8 ở 22°C, đồng nuôi cấy 3. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, rửa khuẩn và cấy chuyển mẫu sang môi trường tái sinh chồi, rồi môi trường chọn lọc. Trong thí nghiệm này tiến hành theo dõi: tỷ lệ mẫu tái sinh chồi, tỷ lệ mẫu chồi còn sống trên môi trường chọn lọc, kết quả

được thể hiện ở bảng 4.

Môi trường đồng nuôi cấy bổ sung 1 mg/lNAA hiệu quả tái sinh chồi cao nhất 66,0% (đối với quýt Đường Canh), 64,3% (đối với Cam Vinh), bổ sung 4mg/l NAA có tỷ lệ tái sinh chồi thấp nhất 56,6% (đối với quýt Đường Canh), 54,3% (đối với Cam Vinh). Điều này có thể giải thích là khi môi trường nuôi cấy có nồng độ NAA cao (4 mg/l) có tác dụng kích thích sự hình thành mô sẹo, nhưng lại ức chế sự tái sinh chồi của mẫu. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu chồi còn sống sót trên môi trường chọn lọc đạt cao nhất khi bổ sung 2 mg/l NAA, còn không bổ sung hay bổ sung 1mg, 3mg và 4 mg/l cho tỷ lệ chồi sống sót trên môi trường chọn lọc đều thấp hơn. Với lượng 2 mg/l lệ chồi sống sót trên môi trường chọn lọc là 19,6% đối với quýt Đường Canh và 18,3% đối với cam Vinh. Như vậy, nồng độ 2 mg/l NAA là mức hợp lý, vừa đủ để dung hòa được hai yếu tố, một mặt có tác dụng kích thích hoạt động phân bào, tăng các tế bào ở pha S, mặt khác cũng không ảnh hưởng nhiều đến khả năng tái sinh chồi của mẫu như đối với nồng độ 3 mg và 4 mg/l NAA. Kết quả thu được tương tự như với kết quả nghiên cứu của Pena et al. (2004) trên giống Carrizo citrange hay của Dias et al. (2000) trên các bộ phận của *Citrus*. Kết quả tương tự cũng được công bố ở nhiều loài cây không thuộc *Citrus* như cây thuốc lá (Villemon, 1997), cây hoa hướng dương (Suttle, 1991) và cây đậu (Jacobsen, 1995).

Thí nghiệm này đã tổng hòa được các điều kiện tối ưu nhất trong giai đoạn đồng nuôi cấy

như nhiệt độ đồng nuôi cấy là 22°C, thời gian đồng nuôi cấy là 3 ngày, nồng độ AS là 50 - 100µM, hàm lượng NAA là 2mg/lít. Để đánh giá hiệu quả chuyển gen, các chồi sống trên môi trường chọn lọc từ công thức tốt nhất của thí nghiệm này được kiểm tra gen GUS bằng cách mỗi chồi cắt lấy một lá, ngâm ủ trong dung dịch đệm có chứa chất X-Gluc. Kết quả được tỷ lệ 5,6% chồi biểu hiện màu xanh lam đối với quýt đường canh và 4,6% đối với cam Vinh. Theo hình 1, gen chuyển *INO-rolB* nằm giữa hai gen chỉ thị là kháng kháng sinh kanamycine và GUS. Trong nghiên cứu này, cả hai chỉ thị trên được sử dụng để chọn lọc, nên chồi nào sống trên môi trường chọn lọc và có màu đặc trưng của gen GUS chứng tỏ gen đã được chuyển vào. Điều này cũng có nghĩa là hiệu quả chuyển gen *INO-rolB* bằng

Agrobacterium tumefaciens vào cây quýt Đường Canh là 5,6% và cam Vinh là 4,6 %. Tuy nhiên số lượng bản copy chuyển vào cần được xác định bằng kỹ thuật Southern Blot. Quá trình lấy mẫu, đặt mẫu trong môi trường đồng nuôi cấy, vi khuẩn *At* phát triển, cây chuyển qua môi trường chọn lọc, tạo chồi được minh họa trên các hình 2, 3 và 4. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Yu et al. (2002) trên giống Xuegan. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen mà chúng tôi thu được vẫn còn thấp hơn so với các kết quả nghiên cứu trên thế giới như: hiệu quả biến nạp gen của giống cam ngọt Bingtan là 10% (Duan, 2006), giống cam ngọt Natal là 11,6%, giống cam ngọt Valencia là 13,8% và giống Rangpur lime là 19,3% (Ameilida, 2003), giống cam ngọt Valencia là 23,8% (Boscariol, 2003).

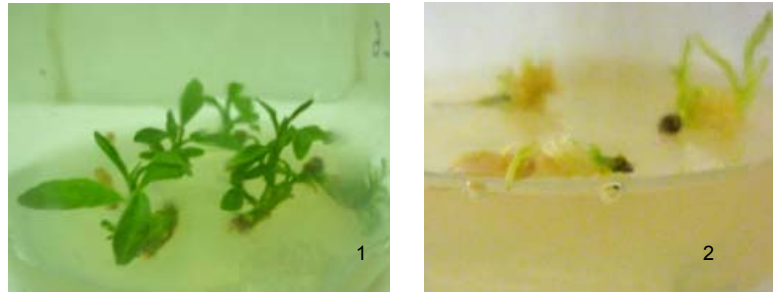
Bảng 4. Ảnh hưởng của việc bổ sung NAA vào môi trường đồng nuôi cấy đến khả năng tái sinh chồi và sống sót của mẫu trên môi trường chọn lọc

Giống	Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi tái sinh %	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc %	Giống	Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi tái sinh %	Tỷ lệ chồi sống trên môi trường chọn lọc %
Quýt Đường canh	0	59,6	17,3	Cam Vinh	0	57,0	16,6
	1	66,0	18,0		1	64,3	17,0
	2	63,3	19,6		2	60,6	18,3
	3	58,3	16,0		3	56,6	15,3
	4	56,6	15,3		4	54,3	14,0



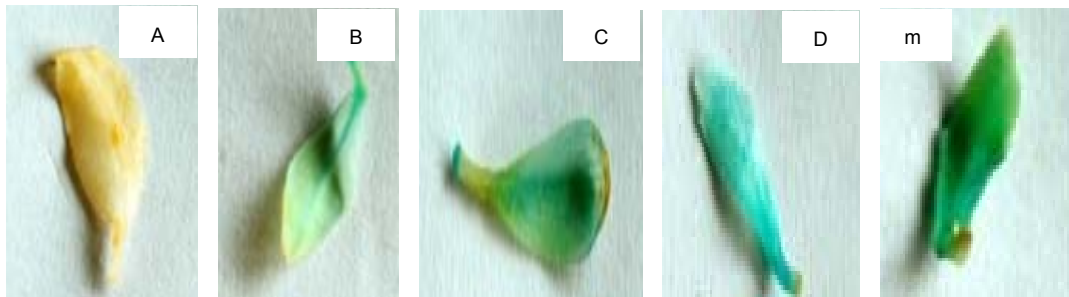
Hình 2. Sự phát triển của *Agrobacterium tumefaciens* và mẫu sau ba ngày đồng nuôi cấy ở các mức nhiệt độ khác nhau trên giống quýt Đường canh

1. Vi khuẩn phát triển rất mạnh phủ kín bề mặt mẫu (25°C),
2. Vi khuẩn phát triển bình thường tạo lớp màng mỏng bao quanh mẫu (22°C),
3. Vi khuẩn phát triển kém (19°C).



Hình 3. Sự phát triển của chồi giống quýt Đường Canh trên môi trường chọn lọc

1. Chồi nhận được gen chuyển phát triển bình thường; 2. Chồi không nhận được gen chuyển bị chết



Hình 4. Biểu hiện gene *GUS* trên lá chồi chuyển gen ở chồi quýt Đường Canh và cam Vinh

A. Lá từ chồi chưa chuyển gen quýt Đường canh;
B và C: Lá từ chồi giống Cam Vinh đã chuyển gene;
D và E: Lá từ chồi quýt Đường Canh đã chuyển gene

4. KẾT LUẬN

Qua các thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian đồng nuôi cấy, ảnh hưởng của acetosyringone và auxin trong môi trường đồng nuôi cấy, chúng tôi đã xác định được các điều kiện tối ưu trong giai đoạn này là: Nhiệt độ đồng nuôi cấy ở 22°C, trong 3 ngày, môi trường đồng nuôi cấy bổ sung 50 – 100µM acetosyringone và 2 mg/l NAA là tốt nhất.

Chuyển được gen miễn cảm auxin (*INO-rolB*) hoạt động đặc thù nhụy vào trụ trên lá mầm của giống quýt Đường Canh và cam Vinh thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58. Tỷ lệ chuyển gen đạt 5,6% đối với quýt Đường Canh và 4,6% đối với cam Vinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alida et al. (2008). Evolution of selection strategies alternative to nptII in genetic transformation of Citrus. Plant Cell rep, 27: 105-115.

Almeida W.A.B., Mourao Filho F.A.A., Mendes B.J.M et al. (2003). *Agrobacterium* – mediated transformation of Citrus sinensis and Citrus limonia epicotyl segments. Scientia Agricola, 60: 23-29.

Boscariol et al. (2003). The use of the Mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants. Plant Cell rep, 22: 122-128.

Bond JE and Roose M.L. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important Citrus cultivar Washington navel orange. Plant Cell Reports, 18: 229-234.

Carmi, N., Salts Y., B. Dedicova, Shabtai S. and Barg R. (2003). Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. Planta 217: 726-735.

Changhe Y, Shu H., Paul L. and Gmitter (2002). Factors affecting *Agrobacterium* – mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. Plant Cell rep, 19: 889-903.

Cervera M., Navarro L., Pena, L. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Rep, 16: 271-278.

- Costa M.G.C., Otoni W.C. and Moore G.C. (2002). An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium-mediated* transformation of *Citrus paradisi* (Macf) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plan Cell Rep.*, 21: 365-373.
- Yan-Xin DUAN, Xin LIU, Jing FAN, Ding-Li LI, Reng-Chao WU and Wen-Wu GUO (2006). Multiple shoot induction from seedling epicotyls and transgenic citrus plant regeneration containing the green fluorescent protein gene, *Botanical Studies* 48: 165-171.
- Dutt M. and Grosser J.W. (2009). Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium-mediated* transformation of citrus. *Plant Cells Tiss Organ Cult* 98: 331-340.
- Ghorbel R., Domínguez A., Navarro L., Peña L. (2000). High efficiency genetic transformation of sour orange and production of transgenic trees containing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Tree Physiology*, 20: 183-189.
- Meister R.J., Williams L.A., Monfared M.M., Gallagher T.L., Kraft E.A., Nelson C.G., Gasser C.S. (2004). Definition and interaction of positive regulatory element of the *Arabidopsis* INNER NO OUTER promote. *Plant J.* 37:426-438.
- Moore G.A., Jacono J.L. et al. (1992). *Agrobacterium-mediated* transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 11: 238-242
- Pena L., Cervera M. et al. (1995). High efficiency *Agrobacterium-mediated* transformation and regeneration of Citrus". *Plant Sci*, 104:183-194.
- Pena L., Cervera M. et al. (2003). *Agrobacterium – mediated* transformation of Citrus". *Plant Sci*, 154:483-494.
- Pena L., Cervera M. et al. (2004). Early Events in *Agrobacterium – mediated* Genetic". *Annals of Botany*, 94: 67-74.