

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN VÀO LAN *Mokara* QUA TRUNG GIAN VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Lý Nguyễn Phước Điềm¹, Nguyễn Xuân Dũng¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Tại Việt Nam, *Mokara* là một trong hai loài lan cắt cành đang được ưa chuộng trên thị trường hiện nay. Việc xây dựng thành công quy trình chuyển gen vào lan này có thể được ứng dụng để nâng cao chất lượng hoa lan. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA4404 mang vector pCAMBIA1301 được sử dụng để chuyển gen mục tiêu vào PLBs của lan *Mokara*. Các yếu tố như môi trường kích thích sự tái sinh PLB từ mẫu lá, môi trường kích thích sự tăng sinh của PLBs, nồng độ chất cảm ứng acetosyringone, nồng độ kháng sinh khử khuẩn và nồng độ kháng sinh sàng lọc PLBs chuyển gen đã được khảo sát. Hiệu quả chuyển gen được xác định dựa trên tỷ lệ mẫu dương tính GUS trên tổng số mẫu được lấy nhiễm. Kết quả cho thấy môi trường Murashige & Skoog (MS) bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 2,0 mg/L NAA cho tỷ lệ tái sinh PLBs từ mẫu lá cao nhất (91,67%) sau 15 tuần nuôi cấy. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L kết hợp 1,0 mg/L NAA thích hợp cho sự tăng sinh PLBs, trọng lượng PLBs đạt 25,70 g sau 8 tuần nuôi cấy. Hiệu quả chuyển gen cao nhất đạt được khi có sự hiện diện của 50 μ M acetosyringone trong quá trình chuyển gen với thời gian đồng nuôi cấy là 2 ngày. Kháng sinh cefotaxime ở nồng độ từ 300 mg/L đến 500 mg/L có khả năng loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn sau thời gian đồng nuôi cấy. Kháng sinh hygromycin ở nồng độ 10 mg/L thích hợp cho giai đoạn sàng lọc PLBs chuyển gen.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển gen, hoa lan, *Mokara*, PLBs

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mokara (*Mokara* spp.) là loài lan lai được tạo ra từ 3 loài *Ascocentrum*, *Vanda* và *Arachnis* (Arditti, 2009). Đây là loài lan có hoa với màu sắc và hoa văn đa dạng, và đang là một trong hai loài hoa lan cắt cành chủ lực tại Việt Nam. Bệnh do virus gây ra gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành sản xuất hoa lan do làm giảm năng suất và chất lượng hoa. Tuy nhiên, các biện pháp kiểm soát virus gây bệnh trên hoa lan theo phương thức truyền thống (bao gồm việc kiểm soát và loại bỏ nguồn nhiễm) vẫn chưa mang lại hiệu quả như mong muốn. Việc nghiên cứu chuyển gen để tạo giống hoa lan có khả năng kháng virus được xem là một trong những giải pháp triển vọng cho vấn đề kiểm soát bệnh virus trên hoa lan ở Việt Nam. Những kết quả khả quan ban đầu về việc tạo giống kháng bằng phương pháp chuyển gen đã được công bố trên loài lan *Dendrobium* (Nguyễn Xuân Dũng và cộng sự, 2015). Đây là tiền đề quan trọng cho việc tiếp tục triển khai các nghiên cứu tạo giống kháng virus trên các loài lan quan trọng khác, trong đó có lan *Mokara*.

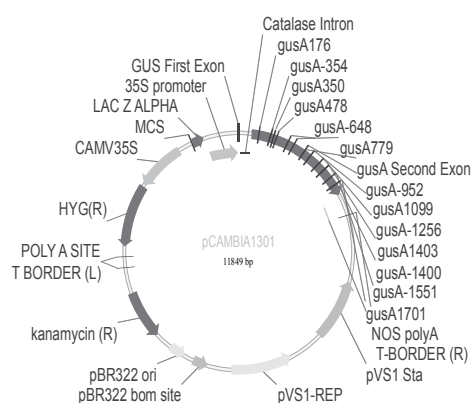
Là bước đầu tiên hướng đến việc tạo giống kháng virus, nghiên cứu này tiến hành thiết lập quy trình chuyển gen vào lan *Mokara* qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Trong đó, các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen như môi trường tái sinh và tăng sinh PLB, nồng độ chất cảm ứng acetosyringone cũng như kháng sinh khử khuẩn và sàng lọc PLB chuyển gen đã được khảo sát.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá của cây lan *Mokara* Fullmoon *in vitro* (cao 3 - 4 cm) được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực Vật - Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mang vector chuyển gen pCAMBIA1301 với vùng T-DNA chứa gen GUS và gen kháng hygromycin (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc vector pCAMBIA1301

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát môi trường thích hợp để tạo PLBs từ mô lá

Cô lập mẫu lá từ cây con *in vitro*, tạo vết thương trên bề mặt và nuôi cấy trên môi trường MS

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

(PhytoTechnology Laboratories®) có bổ sung BA ở các nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/L kết hợp với NAA ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/L. Theo dõi sự tái sinh PLBs theo thời gian nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát môi trường thích hợp cho sự tăng sinh PLBs

Các PLB đơn (kích thước khoảng 1 mm) được tách từ cụm PLBs và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/L kết hợp với NAA ở nồng độ 0,5 và 1,0 mg/L. Sự tăng sinh của PLB được theo dõi và ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Khảo sát hiệu quả gây chết PLBs của hygromycin

Các PLB đơn được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung hygromycin ở các nồng độ 5; 7; 10 và 15 mg/L. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường mới sau mỗi 7 ngày. Tỷ lệ mẫu chết được ghi nhận sau 7, 14 và 21 ngày. Kết quả của thí nghiệm được áp dụng để sàng lọc mẫu giả định chuyển gen.

2.2.4. Khảo sát nồng độ chất cảm ứng acetosyringone thích hợp cho chuyển gen

Một khuẩn lạc *A.tumefaciens* được nuôi lắc qua đêm ở điều kiện tối, trong 30 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 50 mg/L rifamycin (Sigma-Aldrich) và 100 mg/L kanamycin (Sigma-Aldrich), tốc độ lắc 250 vòng/phút ở 28°C đến khi đạt OD₆₀₀ trong ngưỡng 0,6 - 0,8. Vi khuẩn sau khi tăng sinh được tiến hành ly tâm thu sinh khối ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. Sinh khối vi khuẩn sau ly tâm được huyền phù trong 30ml môi trường MS lỏng có bổ sung chất cảm ứng acetosyringone (AS) (PhytoTechnology Laboratories®) ở các nồng độ 0, 50 và 100 µM.

Các PLB đơn được ngâm trong môi trường MS lỏng có bổ sung chất cảm ứng AS ở các nồng độ 0, 50 và 100 µM trong 30 phút. Sau đó mẫu được chuyển sang dịch huyền phù vi khuẩn có bổ sung AS ở nồng độ tương ứng và ủ trong 30 phút. PLBs được làm khô bề mặt trên giấy thấm tiệt trùng trước khi tiến hành đồng nuôi cấy 2 ngày trên môi trường có bổ sung AS ở các nồng độ tương ứng.

Đánh giá hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp nhuộm GUS.

Các PLBs sạch khuẩn và sống sau quá trình sàng lọc với kháng sinh hygromycin được nhuộm GUS

theo quy trình của Nguyễn Xuân Dũng và cộng sự (2014). Theo đó, PLBs được ủ trong dung dịch nhuộm GUS ở 37°C trong 72 giờ; giải nhuộm với ethanol 70% ít nhất trong 4 giờ hoặc đến khi mẫu mất diệp lục hoàn toàn. Sự biểu hiện của gen *GUS* được ghi nhận dưới kính hiển vi soi nổi. Hiệu quả chuyển gen được tính bằng số mẫu biểu hiện gen *GUS* trên tổng số mẫu được lây nhiễm.

2.2.5. Khảo sát nồng độ cefotaxime thích hợp cho để khử khuẩn từ PLBs

Sau thời gian đồng nuôi cấy, PLBs được rửa 3 lần với nước cất vô trùng và 1 lần với môi trường MS lỏng có bổ sung kháng sinh cefotaxime ở các nồng độ 0; 100; 300 và 500 mg/L. Mẫu được làm khô bề mặt trên giấy thấm tiệt trùng trước khi cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA và cefotaxime ở các nồng độ tương ứng. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường mới sau mỗi 7 ngày. Tỷ lệ mẫu sạch khuẩn và mẫu sống được ghi nhận sau 7 và 14 ngày.

2.2.6. Phân tích thống kê

Số liệu từ các thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm xử lý thống kê Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 20.0 (IBM). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xem xét ở giá trị $p < 0,05$ và các giá trị trung bình được so sánh bằng Duncan's test.

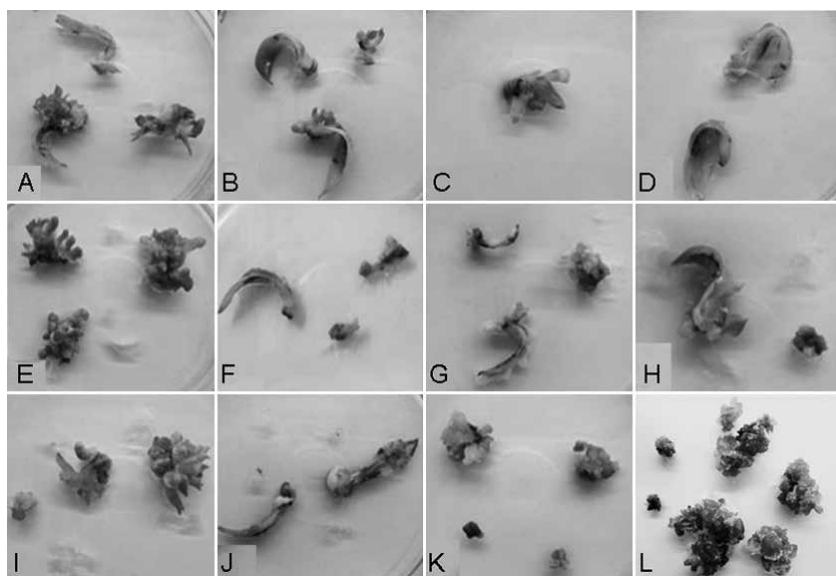
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện trong khoảng thời gian từ 01/2014 đến 12/2015 tại phòng Công nghệ Sinh học Thực Vật, thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tái sinh PLBs từ mẫu lá

Sau 4 tuần nuôi cấy, hầu hết các mẫu đều có cảm ứng với môi trường với phần cuống lá phình to. Sau 8 tuần, một số mẫu có biểu hiện tái sinh tạo cấu trúc mới như mô sẹo, rễ, chồi hoặc PLBs. Các cấu trúc này tiếp tục phát triển tạo thành cụm chồi, cụm PLBs hoặc tạo lá sau 11 tuần. Sau 15 tuần nuôi cấy, sự tái sinh tạo PLBs từ mẫu lá giữa các nghiệm thức có sự khác biệt rõ rệt (Hình 2). Tỷ lệ mẫu lá tái sinh tạo PLBs cao nhất đạt được là 91,67% khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 2,0 mg/L NAA (Bảng 1).



Hình 2. Các mẫu lá sau 15 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau
 A, B, C, D: MS có bổ sung 0,1 mg/L BA kết hợp lần lượt với 0,5; 1,0; 1,5; và 2,0 mg/L NAA
 E, F, G, H: MS có bổ sung 0,3 mg/L BA kết hợp lần lượt với 0,5; 1,0; 1,5; và 2,0 mg/L NAA
 I, J, K, L: MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp lần lượt với 0,5; 1,0; 1,5; và 2,0 mg/L NAA

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu lá tái sinh tạo PLBs sau 15 tuần nuôi cấy

Môi trường	Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%)
	BA	NAA	
MS	0,1	0,5	41,67 ^{abc} ± 20,97
		1,0	8,33 ^c ± 16,67
		1,5	25,00 ^{bc} ± 25,00
		2,0	0,00 ^c ± 0,00
	0,3	0,5	75,00 ^{ab} ± 25,00
		1,0	0,00 ^c ± 0,00
		1,5	75,00 ^{ab} ± 15,96
		2,0	33,33 ^{bc} ± 23,57
	0,5	0,5	45,83 ^{abc} ± 20,83
		1,0	0,00 ^c ± 0,00
		1,5	41,67 ^{abc} ± 14,43

Ghi chú: Bảng 1, 2, 3, 5: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

3.2. Tăng sinh PLBs từ PLB đơn

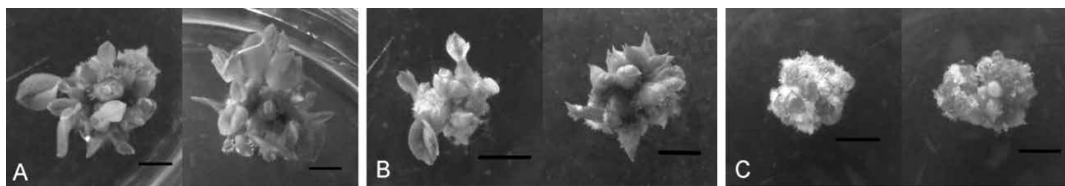
Sau 8 tuần nuôi cấy, các mẫu đều có biểu hiện phát triển và gia tăng khối lượng trên tất cả các môi trường. Tuy nhiên, việc bổ sung BA và NAA đã kích thích sự phát triển của PLB nhiều hơn so với môi trường không có chất kích thích sinh trưởng. Khối lượng mẫu cao nhất đạt được trên môi trường có bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA (36,17 g).

Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA và môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA cho kết quả tăng sinh mẫu tương đương nhau: 25,57 g và 25,70 g (Bảng 2).

Bảng 2. Khối lượng của PLB sau 8 tuần nuôi cấy

Môi trường	Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)		Khối lượng PLB (g)	
	BA	NAA		
MS	0	0	9,47 ^g ± 0,36	
		0,5	0,5	12,90 ^f ± 0,28
			1,0	25,70 ^b ± 0,37
		1,0	0,5	16,53 ^e ± 0,27
	1,0		10,00 ^g ± 0,38	
	1,5	0,5	17,67 ^d ± 0,31	
		1,0	20,17 ^c ± 0,28	
	2,0	0,5	25,57 ^b ± 0,34	
		1,0	36,17 ^a ± 0,36	

Môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA và môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA tuy có kích thích PLB đơn tăng sinh thành cụm PLBs nhưng các cụm này nhanh chóng phát triển thành chồi (Hình 3A, Hình 3B). Mặt khác, môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA có khả năng tăng sinh PLB đơn và duy trì trạng thái PLB sau 8 tuần (Hình 3C). Kết quả cho thấy đây là môi trường thích hợp để kích thích sự nhân nhanh số lượng của PLBs.



Hình 3. Sự phát triển của PLB đơn sau 60 ngày nuôi cấy.

A: MS bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA; B: MS bổ sung 2,0 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA; C: MS bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1 mg/L NAA. (thanh ngang tương ứng 5mm)

3.3. Hiệu quả gây chết PLB của hygromycin

Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu trên môi trường có bổ sung 10 mg/L và 15 mg/L hygromycin có hiện tượng chết dần. Sau 14 ngày nuôi cấy, hiện tượng mẫu chết

xuất hiện ở tất cả các nồng độ hygromycin được khảo sát. Tỷ lệ này tiếp tục tăng dần và đạt 100% sau 21 ngày trên môi trường có bổ sung 10 mg/L và 15 mg/L hygromycin (Bảng 3).

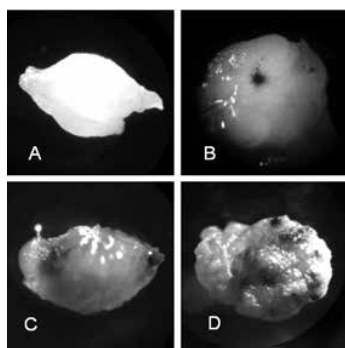
Bảng 3. Hiệu quả gây chết PLBs không chuyển gen của hygromycin theo thời gian nuôi cấy

Nồng độ hygromycin (mg/L)	Tỷ lệ mẫu chết theo thời gian (%)		
	7 ngày	14 ngày	21 ngày
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ^c ± 0,00
5	0,00 ± 0,00	33,33 ^c ± 13,33	53,33 ^b ± 17,64
7	0,00 ± 0,00	46,67 ^{bc} ± 6,67	80,00 ^{ab} ± 11,55
10	6,67 ± 6,67	66,67 ^{ab} ± 6,67	100,00 ^a ± 0,00
15	20,00 ± 20,00	73,33 ^a ± 6,67	100,00 ^a ± 0,00

Như vậy, hygromycin ở nồng độ 10 mg/L thích hợp để sàng lọc mẫu giả định chuyển gen. Kết quả này phù hợp với một nghiên cứu về chuyển gen trên PLBs lan *Vanda* của Shrestha và cộng sự (2010), trong đó, 10 mg/L hygromycin cũng được sử dụng để chọn lọc PLBs giả định chuyển gen.

3.4. Ảnh hưởng của acetosyringone đến hiệu quả chuyển gen vào PLBs

Sau khi nhuộm GUS và giải nhuộm, mẫu đối chứng không chuyển gen mất màu hoàn toàn (hình 4A), mẫu được chuyển gen có màu xanh đặc trưng xuất hiện thành từng chấm nhỏ (hình 4B), thành mảng (hình 4C) hoặc rải rác khắp bề mặt mẫu (hình 4D).



Hình 4. Kết quả nhuộm GUS các PLBs.

A: PLB không chuyển gen; B, C và D: PLBs chuyển gen

Kết quả cho thấy, trường hợp không bổ sung AS vào giai đoạn lây nhiễm và đồng nuôi cấy có tỷ lệ dương tính GUS là 9,72%. Tỷ lệ này tăng lên 12,5% khi tăng nồng độ AS đến 50 µM nhưng lại giảm xuống 9,03% khi nồng độ AS tiếp tục tăng đến 100 µM (Bảng 4).

Bảng 4. Tỷ lệ mẫu dương tính GUS

Nồng độ AS (µM)	Tỷ lệ dương tính GUS (%)
0	9,72
50	12,50
100	9,03

Sự hiện diện của chất cảm ứng AS ngoại sinh được cho là có khả năng nâng cao hiệu quả chuyển gen trong một số nghiên cứu trên lan. Kết quả nghiên cứu của Gnasekaran và cộng sự (2014) cho thấy hiệu quả chuyển gen trên *Vanda* tăng từ 40 lên 75% khi tăng nồng độ AS ngoại sinh từ 150 lên 200 µM. Tuy nhiên nồng độ AS trên 200 µM lại gây tác động tiêu cực đến PLBs *Vanda*, làm gia tăng tỷ lệ mẫu hóa nâu và chết; đồng thời hiệu quả chuyển gen cũng giảm xuống 32%. Kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Uddain và cộng sự (2015) về chuyển gen trên PLB của lan *Dendrobium*.

Mặt khác, chất coniferyl alcohol được tìm thấy ở lan *Dendrobium* đã được khẳng định là chất cảm

ứng vir genes ở *A.tumefaciens* tương tự như AS; và nồng độ của coniferyl alcohol ở PLBs cao hơn so với các mô khác (cao hơn 11 lần so với mô lá) (Nan *et al.*, 1997). Đây là một trong những nguyên nhân PLBs được xem là nguồn vật liệu chuyển gen thích hợp. Bên cạnh đó, một số công trình cũng đã thu được các mẫu chuyển gen trong điều kiện không bổ sung chất cảm ứng AS ngoại sinh như nghiên cứu chuyển gen trên lan *Oncidium* (Liau *et al.*, 2003), lan *Vanda* (Shrestha *et al.*, 2007; Gnasekaran *et al.*, 2014), lan *Cattleya* (Zhang *et al.*, 2010), lan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (Semarti *et al.*, 2011) và lan *Dendrobium chrysotoxum* Lindl (Bunnag, Pilahome, 2012).

3.5. Hiệu quả khử khuẩn trên PLBs của cefotaxime

Sau 7 ngày nuôi cấy, 100 mg/L cefotaxime cho tỷ lệ mẫu sạch khuẩn cao nhất (99,39%). Tuy nhiên tỷ lệ này giảm khi kéo dài thời gian khử khuẩn, có thể do nồng độ này chỉ có khả năng ức chế tạm thời sức sống của vi khuẩn. Mặt khác, cefotaxime ở nồng độ 300 mg/L và 500 mg/L cho tỷ lệ mẫu sạch khuẩn tăng khi kéo dài thời gian khử khuẩn. Về mặt ý nghĩa thống kê, hiệu quả diệt khuẩn của cefotaxime ở 3 nồng độ là tương tự nhau. Tuy nhiên về số liệu thực tế, 300 mg/L và 500 mg/L cefotaxime có khả năng diệt trên 98% khuẩn sau 14 ngày (Bảng 5).

Bảng 5. Hiệu quả khử khuẩn trên PLBs của cefotaxime

Nồng độ cefotaxime (mg/L)	Thời gian khử khuẩn			
	7 ngày		14 ngày	
	Tỷ lệ mẫu sạch khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sạch khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
0	2,02 ^b ± 2,02	85,86 ^b ± 4,76	0,00 ^b ± 0,00	73,74 ^b ± 8,24
100	99,39 ^a ± 0,60	95,76 ^a ± 1,36	88,49 ^a ± 8,72	92,12 ^a ± 2,51
300	96,97 ^a ± 2,44	96,36 ^a ± 1,88	98,18 ^a ± 1,30	88,39 ^a ± 2,86
500	98,79 ^a ± 1,21	97,57 ^a ± 1,01	100 ^a ± 0,00	88,49 ^a ± 3,25

Kết quả cho thấy, kháng sinh cefotaxime ở nồng độ từ 300 mg/L đến 500 mg/L có thể được dùng để khử khuẩn trên mẫu PLBs sau thời gian đồng nuôi cấy và quá trình khử khuẩn có thể kéo dài đến 14 ngày để đảm bảo mẫu sạch khuẩn. Cefotaxime ít độc hại với thực vật khi so sánh với các loại kháng sinh khử khuẩn khác như carbenicillin, vancomycin và timentin (Teixeira da Silva, Fukai, 2001). Ảnh hưởng của cefotaxime đến sự sống và phát triển của PLB cũng đã được nghiên cứu bởi Artichart và cộng sự vào năm 2007; trong đó, PLB lan *Dendrobium secundum* vẫn có khả năng sống trong điều kiện có 500 mg/L cefotaxime. Kháng sinh này đã được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu chuyển gen thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens* với nồng độ từ 250 mg/L đến 500 mg/L như công trình của Belarmino và Mii (2000), Men và cộng sự (2003), Artichart và cộng sự (2007), Nguyễn Xuân Dũng và cộng sự (2015).

IV. KẾT LUẬN

- Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 2,0 mg/L NAA kích thích sự tái sinh PLBs từ mô lá lan *Mokara* và môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 1,0 mg/L NAA thích hợp để nhân nhanh PLBs từ PLB đơn.

- Gen *GUS* đã được chuyển thành công vào PLB với hiệu quả cao nhất là 12,5% khi bổ sung 50 µM acetosyringone vào quá trình lây nhiễm và đồng nuôi cấy.

- Kháng sinh cefotaxime ở nồng độ từ 300 mg/L đến 500 mg/L thích hợp để khử khuẩn trên PLBs và kháng sinh hygromycin ở nồng độ 10 mg/L có hiệu quả trong việc sàng lọc mẫu giả định chuyển gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Xuân Dũng, Dương Hoa Xô, Chu Hoàng Hà, 2014. Tối ưu hóa sự chuyển nạp gen ở lan *Dendrobium Sonia* qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí sinh học* 36(1se): 257-265.
- Nguyễn Xuân Dũng, Dương Hoa Xô, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Chu Hoàng Hà, 2015. Nghiên cứu chuyển gen RNAi qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* vào *Dendrobium Sonia* để tạo giống kháng virus khảm vàng. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2015 13(2): 264-271.
- Arditti, J., 2009. *Micropropagation of Orchids*, Vol. 1. John Wiley & Sons, NY.
- Artichart, P., Bunnag, S. and Theerakulpisut, P., 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl with antisense ACC oxidase. *Asian J Plant Sci* 6(7): 1065-1071.

- Belarmino, M.M. and Mii, M.**, 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep* 19: 435-442
- Bunnag, S. and Pilahome, W.**, 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Afr J Biotechnol* 11(10): 2472-2476.
- Gnasekaran, P., Antony, J.J.J., Uddain, J. and Subramaniam, S.**, 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of the recalcitrant *Vanda* Kasem's Delight orchid with higher efficiency. *The Scientific World Journal* 2014: 1-10.
- Liau, C.H., You, S.J., Prasad, V., Hsiao, H.H., Lu, J.C., Yang, N.S. and Chan, M.T.**, 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep* 21(10): 993-998.
- Men, S., Ming, X., Liu, R., Wei, C. and Li, Y.**, 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75: 63-71.
- Nan, G.L., Tang, C.S., Kuehnle, A.R. and Kado, C.I.**, 1997. *Dendrobium* orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 391-399.
- Semiarti, E., Indrianto, A., Purwantoro, A., Martiwi, I.N.A., Feroniasanti, Y.M.L., Nadifah, F., Mercuriani, I.S., Dwiyani, R., Kojima, S., Machida, Y. and Machida, C.**, 2011. Establishment of high-frequency genetic transformation method of Indonesian orchid species mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of Nagoya International Orchid Congress*, Japan, 32-39.
- Shrestha, B.R., Chin, D.P., Tokuhara, K. and Mii, M.**, 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vanda* using protocorm-like bodies. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol* 18(1): 225-228.
- Teixeira da Silva, J.A. and Fukai, S.**, 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *Journal of Applied Horticulture* 3(1): 3-12.
- Uddain, J., Zakaria, L., Lynn, C.B. and Subramaniam, S.**, 2015. Preliminary assessment on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* Broga Giant orchid's PLBs. *Emir J Food Agric* 27(9): 669-677.
- Zhang, L., Chin, D.P., Fukami, M., Ichikawa, H., Nakamura, I. and Mii, M.**, 2010. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Cattleya* with an *Odontoglossum ringspot virus* replicase gene sequence. *Plant Biotechnol* 27: 421-426.

Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Mokara* orchid

Ly Nguyen Phuoc Diem, Duong Hoa Xo, Nguyen Xuan Dung

Abstract

Mokara spp. is currently one of the most important orchid genera in Vietnam and it is favorite as a cut flower orchid as well as a potted plant. Therefore, developing an efficient genetic transformation protocol for this orchid is essential for improving its qualities. This study focused on examining the influence of the concentration of acetosyringone on transformation efficiency and evaluating suitable concentration of antibiotics for bacteria elimination after co-culture period and selection of putative transformants using disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harbouring vector pCAMBIA1301. Other factors such as proliferation of PLBs from leaf explants and multiplication of PLBs were also studied using Murashige & Skoog (MS) media supplemented with different concentrations of plant growth hormones BA and NAA. The results showed that MS media supplemented with 0.5 mg/L BA and 2 mg/L NAA induced highest PLB proliferation rate (91.67%) from leaf explants after 15 weeks of culture. MS media supplemented with 0.5 mg/L BA and 1 mg/L NAA is suitable for PLB multiplication and the fresh weight of PLBs was 25.70 g after 8 weeks of culture. The transformation efficiency was defined as the number of PLBs expressing GUS by the total number of inoculated PLBs. And the highest efficiency was obtained when 50 µM acetosyringone was added to the bacterial suspension and co-culturing media with 2 days of the co-culture period. Concentration of cefotaxime from 300 mg/L to 500 mg/L was able to eliminate bacteria on PLB after co-culture period and hygromycin at 10 mg/L was effective for selection of putative transformants.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, orchid, *Mokara*, PLBs

Ngày nhận bài: 9/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sử

Ngày phản biện: 13/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

TẠO CÁC DÒNG BIẾN DỊ HOA CHUÔNG (*Gloxinia speciosa*) BẰNG TIA GAMMA NGUỒN COBALT 60

Nguyễn Hoàng Quân¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Phương pháp gây đột biến nhân tạo bằng bức xạ tia Gamma nguồn Cobalt 60 được thực hiện nhằm đa dạng hóa màu sắc hoa, lá, kiểu hoa và dạng lá của cây hoa chuông. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Liều chiếu xạ gây chết 50% lượng mẫu (LD50) được xác định đối với mô sẹo/chồi non *in vitro* là 97,2 Gy sau 1 tháng; 85 Gy sau 2 tháng, đã xuất hiện nhiều biến dị về màu sắc lá trong giai đoạn *in vitro*. Các dòng biến dị sau khi được chọn lọc *in vitro*, tiếp tục được theo dõi biến dị về kiểu hình hoa ở giai đoạn *ex vitro*. Kết quả đánh giá và sàng lọc *ex vitro* đã phát hiện 6 dòng biến dị có màu sắc và kiểu hình hoa khác biệt so với dòng đối chứng. Kết quả cho thấy cả 6 dòng biến dị đều có khả năng sinh trưởng khỏe, hoa, lá đẹp và thích nghi với điều kiện sản xuất.

Từ khóa: Hoa chuông, *Gloxinia speciosa*, Cobalt 60, chiếu xạ, biến dị

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu về đột biến do phóng xạ cho thấy trong một giới hạn liều lượng, tần số các đột biến phụ thuộc tuyến tính vào liều lượng chiếu xạ (Vũ Như Ngọc, 2005). Để thu được đột biến mong muốn, người ta cần chiếu xạ ở liều lượng thích hợp để tạo ra nhiều đột biến cho chọn lọc mà không làm chết nhiều cây cũng như làm tăng độ bất thụ của chúng (Lê Xuân Đắc, 2008; Từ Bích Thủy, 1994). Đó là liều lượng tối hạn mà ở mức liều này, số lượng đột biến thu được nhiều nhất, thường được xác định trong khoảng gần liều LD50. Liều LD50 là liều mà khi hấp thụ, 50% số cá thể được xử lý bức xạ bị chết.

Theo công bố chính thức của FAO/IAEA (2012) đã có 3200 giống đột biến trên 214 loài thực vật khác nhau ở 60 quốc gia trên thế giới. Tỷ lệ cây đột biến được công bố nhiều nhất ở châu Á (hơn 60%), trong đó Trung Quốc chiếm hơn 25%. Chiếu xạ trên mô thực vật nuôi cấy *in vitro* giúp khắc phục được các đột biến ở thể khảm khi chiếu xạ hạt giống hoặc cây hoàn chỉnh. Tác giả Đào Thanh Bằng (2006) nghiên cứu chọn giống hoa cúc (Fuji white standard) bằng phương pháp chiếu xạ *in vitro*, thu được 4 loại đột biến khác nhau theo màu sắc và cánh hoa. Lê Văn Hòa (2006) đã ứng dụng công nghệ gây đột biến bằng colchicine và tia gamma trên các mầm phôi tái sinh từ các mô nuôi cấy trong ống nghiệm, nhằm tạo ra các dòng Dendrobium chất lượng cao. Arunee (2007) chiếu xạ tia gamma lên mẫu lá của cây violet, sau đó tái sinh lá được chiếu xạ ở điều kiện tự nhiên và thu được các dòng hoa violet mang biến dị về màu sắc, hình dạng, kích thước hoa, màu sắc lá và độ dày của lá. Lê Quang Luân (2009) đã xác định liều chiếu xạ LD50 của bức xạ gamma Co⁶⁰ đối với mẫu cấy *in vitro* ở cây lan hài và địa lan là 20 - 30 Gy trên PLB cho biến dị nhiều nhất và đã chọn lọc khoảng 100

dòng biến dị tập trung vào 5 dạng sau: Mất sắc tố Chlorophyll, lá ngắn, lá dài, nhiều lá, thay đổi màu bẹ lá (xanh sang tím). Nagatomi khi ứng dụng kỹ thuật chiếu xạ tia gamma đối với cây hoa cúc đã xác định được liều chiếu xạ là 100 Gy đối với ngưỡng gây chết 50% và 150 Gy đối với ngưỡng gây chết hoàn toàn. Số lượng hoa tỷ lệ nghịch với liều lượng chiếu xạ (Nagatomi, 2009).

Cây hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) là một trong những loại hoa mới được du nhập vào Việt Nam trong những năm gần đây dùng để trang trí nội thất, văn phòng, khách sạn. Hoa chuông kép được nhiều người tiêu dùng ưa thích do có kích thước lớn, nhiều cánh, lâu tàn, bộ lá to và trái đều. Nghiên cứu "Tạo các dòng biến dị hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) bằng tia gamma nguồn Cobalt 60" được tiến hành để chọn, tạo nhiều dòng hoa chuông biến dị có màu sắc đẹp, kiểu hoa mới lạ, hoa lâu tàn, đáp ứng nhu cầu sản xuất và tiêu thụ tại thành phố Hồ Chí Minh và các vùng lân cận.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn mẫu *in vitro*

Cắt đốt thân của cây hoa chuông màu đỏ, mép cánh hoa có viền trắng. Tiến hành khử trùng đốt thân bằng dung dịch Javel theo tỷ lệ 1 Javen (0,5% Cloride): 3 nước, trong thời gian 7 phút. Sau đó cấy mẫu vào môi trường MS trong 2 - 3 tuần để mẫu nảy chồi. Chồi hình thành nhiều lá, cắt lá, gây tổn thương đặt trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA sau 2 tuần để tạo sẹo. Các mô sẹo được chuyển sang môi trường MS để ổn định 3-5 ngày, đảm bảo mẫu vô trùng rồi tiến hành chiếu xạ tia gamma nguồn Cobalt 60.

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh