

Bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào chủng nấm sợi thực phẩm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Thái Hạnh Dung¹, Trịnh Thị Minh¹, Ngô Ánh Ngọc¹, Nguyễn Thị Ngân Giang¹, Trần Văn Tuấn^{1,2*}

¹Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/7/2024; ngày chuyển phân biện 4/7/2024; ngày nhận phân biện 9/8/2024; ngày chấp nhận đăng 19/8/2024

Tóm tắt:

Aspergillus luchuensis là loài nấm sợi nổi tiếng trong công nghiệp sản xuất rượu truyền thống tại Nhật Bản. Đây là loài nấm sợi an toàn và không sinh độc tố nấm. Nấm sợi *A. luchuensis* có khả năng sử dụng nhiều loại cơ chất giá rẻ và sinh tổng hợp nhiều loại enzyme có giá trị như amylase, protease, xylanase. Tuy nhiên, các nghiên cứu về cải biến di truyền ở *A. luchuensis* vẫn còn tương đối hạn chế, đặc biệt là tại Việt Nam. Nghiên cứu này giới thiệu chủng *A. luchuensis* AL1 có nguồn gốc từ thực phẩm, được phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự ba vùng gen độc lập gồm ITS của rDNA, gen β -tubulin (*benA*) và calmodulin (*CaM*). Bước đầu nghiên cứu này đã thành công trong chuyển gen vào *A. luchuensis* AL1 nhờ sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và gen kháng hygromycin B. Hiệu suất chuyển gen đạt 40 thể chuyển gen/10⁶ bào tử nấm và không xuất hiện các khuẩn lạc dương tính giả. Với phương pháp chuyển gen này, chủng *A. luchuensis* AL1 đã được tích hợp thành công thêm gen mã hóa protein huỳnh quang xanh (GFP) dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans*. Phân tích các chủng chuyển gen GFP dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy sự biểu hiện mạnh của protein GFP ở toàn hệ sợi của nấm.

Từ khóa: *Aspergillus luchuensis*, chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, gen kháng hygromycin B, huỳnh quang xanh (GFP).

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.10, 4.6

A preliminary study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the food filamentous fungus *Aspergillus luchuensis* AL1

Hanh Dung Thai¹, Thi Minh Trinh¹, Anh Ngoc Ngo¹, Thi Ngan Giang Nguyen¹, Van Tuan Tran^{1,2*}

¹Genomics Unit, National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 1 July 2024; revised 9 August 2024; accepted 19 August 2024

Abstract:

Aspergillus luchuensis is a filamentous fungus renowned in the traditional alcohol production industry in Japan. This species has been proven to be safe and does not produce fungal toxins. The *A. luchuensis* fungus is capable of utilising various inexpensive substrates and synthesising many valuable enzymes such as amylase, protease, and xylanase. However, research on genetic modification in *A. luchuensis* remains relatively limited, especially in Vietnam. This study introduced an *A. luchuensis* AL1 strain derived from food, which was classified based on morphological characteristics and sequence analysis of three independent gene regions, including the ITS of rDNA, β -tubulin (*benA*) gene, and calmodulin (*CaM*) gene. Initial research on gene transfer into *A. luchuensis* AL1 using *Agrobacterium tumefaciens* and the hygromycin B resistance gene has been successful. The efficiency of genetic transformation reached 40 transformants per 10⁶ fungal spores, and no false-positive colonies were observed. With this gene transfer method, the gene encoding green fluorescent protein (GFP), regulated by the *gpdA* promoter from *Aspergillus nidulans*, was successfully transferred into the *A. luchuensis* AL1 strain. Analysis of the GFP-tagged transformants under a fluorescence microscope showed strong expression of the GFP protein in the fungal mycelia.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), *Aspergillus luchuensis*, green fluorescent protein (GFP), hygromycin B antibiotic resistance gene.

Classification numbers: 1.6, 2.10, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: tuantran@vnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Nấm *Aspergillus luchuensis* đã được sử dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất hai loại rượu chưng cất truyền thống của Nhật Bản là rượu shochu và rượu awamori. Ngoài ra, *A. luchuensis* cũng được dùng để sản xuất rượu sake, rượu gạo, makgeolli, meju, tương đậu nành và nước tương ở Trung Quốc và Hàn Quốc [1, 2]. Nấm sợi *A. luchuensis* tiết ra nhiều loại enzyme giúp thủy phân các nguyên liệu thô như gạo, lúa mì, khoai lang thành đường, phù hợp cho lên men rượu. Bên cạnh đó, *A. luchuensis* cũng tiết lượng lớn axit citric vào môi trường nuôi cấy, giúp duy trì pH thấp và hạn chế vấn đề tạp nhiễm vi sinh vật khác trong quá trình lên men [3]. Nấm *A. luchuensis* có các đặc điểm hình thái tương tự với *Aspergillus niger* và *Aspergillus tubingensis* trong cùng phân nhóm *Aspergillus* đen Nigri. Tuy nhiên, cụm gen tham gia vào sinh tổng hợp các loại độc tố nấm (mycotoxin) như ochratoxin A và fumosinin B2 không có mặt trong hệ gen của *A. luchuensis* khi so sánh với nấm *A. niger*. Điều này xác nhận sự an toàn của nấm *A. luchuensis* trong sản xuất thực phẩm và đồ uống [2].

Hiện nay, việc thực hiện cải biến di truyền đối với nấm *A. luchuensis* vẫn còn tương đối hạn chế. Một số nghiên cứu về CRISPR/Cas9 trong bất hoạt gen, chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast), hay chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) đã được áp dụng ở *A. luchuensis*. Trong đó, các marker chọn lọc thường được sử dụng là gen kháng kháng sinh như hygromycin B, phleomycin. Tuy nhiên, các thể chuyển gen thường kém bền khi cấy truyền và chỉ đạt khoảng 21% thể chuyển gen bền thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 khi gen kháng hygromycin B được lựa chọn làm marker chọn lọc [4]. Phương pháp chuyển gen ATMT được cho là có lợi thế hơn trong chuyển gen ở nấm sợi nhờ hiệu quả chuyển gen cao, giá thành rẻ do không cần phải tạo tế bào trần và vùng T-DNA được tích hợp bền vào trong hệ gen của vật chủ [5]. Gần đây, các hệ thống chuyển gen hiệu suất cao sử dụng phương pháp ATMT cho nấm *A. niger* đã được phát triển [6, 7]. Đặc biệt, sự xuất hiện của các thể chuyển gen dương tính giả ở các chủng *A. niger* khác nhau đã bị ức chế đáng kể nhờ kỹ thuật phủ màng [6]. Nghiên cứu này đã cho thấy việc sử dụng phương pháp ATMT để cải biến di truyền ở nấm *A. luchuensis* với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B với kỹ thuật phủ màng rất hiệu quả. Chúng tôi cũng đã thực hiện thành công việc biểu hiện protein huỳnh quang xanh (GFP) ở nấm *A. luchuensis* AL1.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng nấm sợi *A. luchuensis* AL1 có nguồn gốc từ thực phẩm được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống của Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym

và Protein. Chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 chứa plasmid Ti siêu độc lực (plasmid pTiBo542 với các gen *vir* bổ sung từ chủng *Ag. tumefaciens* A281) với phạm vi vật chủ rộng và hiệu suất chuyển gen cao được sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT [8].

Vector nhị thể pGreen2 bao gồm gen kháng kháng sinh hygromycin dưới sự điều hoà của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans* và đoạn gen mã hoá protein huỳnh quang xanh GFP dưới sự điều hoà của promoter *gpdA* từ nấm *A. nidulans*. Vector pGreen2 được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein [9].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu bào tử nấm

Chủng nấm sợi *A. luchuensis* AL1 được nuôi trên môi trường PDA (potato dextrose agar) trong 5 ngày ở 30°C. Nước cất vô trùng được bổ sung lên bề mặt đĩa và bào tử được tách ra khỏi hệ sợi nấm nhờ que gạt vô trùng. Hỗn hợp dịch thu được từ đĩa nuôi cấy được lọc qua màng Miracloth (Đức) và ly tâm trong 15 phút với tốc độ 4000 vòng/phút. Bào tử nấm AL1 trong phần cặn ly tâm được tiếp tục rửa thêm 2 lần với nước cất vô trùng và được pha về nồng độ 10⁶ bào tử/ml phục vụ các thí nghiệm kế tiếp.

2.2.2. Xác định đặc điểm hình thái của chủng *Aspergillus luchuensis* AL1

5 µl dịch bào tử của chủng AL1 ở nồng độ 10⁶ bào tử/ml được nhỏ lên môi trường CYA (Czapek Yeast Extract Agar) (0,5% cao nấm men, 3% sucrose; 0,3% NaNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄·7H₂O; 0,001% FeSO₄·7H₂O; 0,005% CuSO₄·5H₂O; 0,001% ZnSO₄·7H₂O; 2% agar; pH 5,5) để quan sát hình thái hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử. Mẫu được nuôi ở 30°C trong 4 ngày.

2.2.3. Định danh chủng *Aspergillus luchuensis* AL1 bằng giải trình tự

DNA hệ gen của chủng *A. luchuensis* AL1 được tách chiết từ hệ sợi nấm [9]. Khuếch đại vùng trình tự ITS, β-tubulin (*benA*) và calmodulin (*CaM*) từ DNA hệ gen với các cặp mồi đặc hiệu (ITS1/ITS4 dùng cho khuếch đại đoạn ITS, Bt2a/Bt2b dùng cho khuếch đại đoạn gen *benA*, Cmd5/Cmd6 dùng cho khuếch đại đoạn gen *CaM*) và tinh sạch (bảng 1). Vùng ITS, β-tubulin và calmodulin được giải trình tự bởi 1st BASE (Singapore) và được phân tích, so sánh với dữ liệu GenBank. Từ các thông tin thu được, cây phát sinh chủng loại được xây dựng nhờ phần mềm MEGA11, dựa trên phương pháp Neighbor Joining với mô hình sao chép mẫu (bootstrap) 1000 lần.

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[10]
ITS4	TCCTCCGTTATTGATATGC	
Bt2a	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC	[11]
Bt2b	ACCCTCAGTGATGACCTTGCC	
Cmd5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	[12]
Cmd6	CCGATAGAGGTCATAACGTGG	
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	[9]
GFP-R	TCACTGTACAGCTCGTCCATGC	

2.2.4. Đánh giá mức độ miễn cảm của chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 với kháng sinh hygromycin B

10 µl dịch bào tử nấm ở nồng độ 10^6 bào tử/ml được nhỏ lên môi trường CDA (Czapek Dox Agar) (3% sucrose; 0,3% NaNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 0,001% FeSO₄.7H₂O; 0,005% CuSO₄.5H₂O; 0,001% ZnSO₄.7H₂O; 2% agar; pH 5,5) đã được thêm 300, 600 và 900 mg/l kháng sinh hygromycin B và nuôi cấy trong 5 ngày ở 30°C. Nồng độ kháng sinh hygromycin B ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của chủng nấm *A. luchuensis* AL1 sẽ được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen.

2.2.5. Chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 và xác nhận các thể chuyển gen

Việc chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1 được thực hiện tương tự với chuyển gen nhờ vi khuẩn *Ag. tumefaciens* vào nấm *A. niger* sử dụng kỹ thuật phủ màng [6]. Vector nhị thể pGreen2 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện. Bổ sung 200 ng vector pGreen2 vào ống chứa sẵn 50 µl tế bào AGL1 khả biến, trộn nhẹ và chuyển toàn bộ hỗn hợp sang cuvet 2 mm cấm trên đá. Đặt cuvet vào buồng dung hợp của hệ thống chuyển gen bằng xung điện Gene Pulse Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad, Hoa Kỳ) và kích hoạt xung điện với các thông số 2500 V, 400 Ω và 25 µF. Thêm vào cuvet biến nạp 500 µl môi trường LB (Luria Bertani) lỏng và trộn đều. Tiến hành nuôi lắc hỗn hợp chứa AGL1 đã biến nạp trong 1 giờ ở 28°C với tốc độ 200 vòng/phút. Sau 1 giờ, dịch nuôi được ly tâm trong 20 giây ở tốc độ 8000 vòng/phút. Tiến hành cấy trải phần cấy ly tâm trên đĩa LB có bổ sung kháng sinh kanamycin ở nồng độ 100 mg/l và nuôi cấy 2-3 ngày ở 28°C. Các khuẩn lạc được kiểm tra đã nhận được vector pGreen2 nhờ PCR với cặp mồi dùng cho khuếch đại đoạn gen mã hóa protein huỳnh quang xanh: GFP-F/GFP-R.

Vì khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 đã được xác nhận là mang vector pGreen2 được sử dụng để thực hiện chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1. Vi khuẩn và bào tử nấm (nồng độ 10^6 bào tử/ml) được đồng nuôi cấy trên môi trường IM (Induction Medium) có chứa 200 µM acetosyringone (AS) trong 60 giờ ở 20°C. Màng giấy lọc cellulose được chuyển sang môi trường chọn lọc CDA bổ sung kháng

sinh hygromycin B (300 mg/l) và kháng sinh cefotaxime (300 mg/l). 10 ml môi trường CDA có hygromycin B và cefotaxime tiếp tục được đổ lên màng cellulose. Tiếp tục sàng lọc trên môi trường CDA có chứa hygromycin B (300 mg/l) các khuẩn lạc nấm xuất hiện trên môi trường chọn lọc sau 4 ngày ủ ở 30°C.

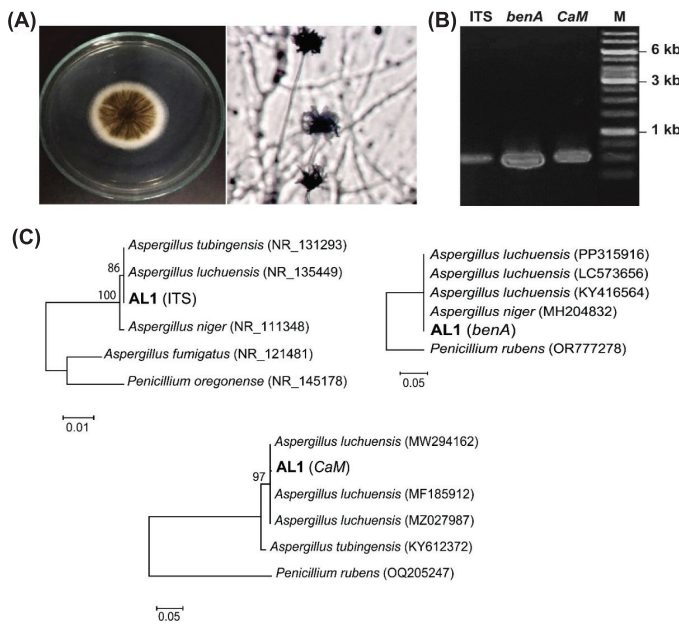
Các thể chuyển gen kháng kháng sinh hygromycin sau đó được thuần khiết và nuôi cấy để tách chiết DNA tổng số. Sự tích hợp của cấu trúc biểu hiện protein GFP vào hệ gen nấm được kiểm tra nhờ PCR với cặp mồi GFP-F/GFP-R. Sự biểu hiện của protein GFP ở hệ sợi của các thể chuyển gen được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1

Sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường CYA, chủng AL1 đã sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng và bào tử màu đen (hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi, hệ sợi của nấm AL1 bao gồm cấu trúc sợi phân nhánh, cấu trúc sinh bào tử dạng hoa cúc (hình 1A). Các đặc điểm trên tương đồng với các đặc điểm của nấm *Aspergillus* thuộc phân nhóm Nigri [13].

Do các đặc điểm hình thái của *A. luchuensis* tương tự với *A. niger* và *A. tubingensis* trong phân nhóm Nigri nên rất khó phân biệt các loài này với nhau nếu dựa trên đặc điểm kiểu hình [3]. Phân tích tổng hợp các trình tự rDNA-ITS, β-tubulin, calmodulin cho thấy các chủng *A. luchuensis* khác biệt với *A. tubingensis* và *A. niger* [14]. Chúng tôi tiếp tục định danh dựa trên trình tự của 3 vùng gen bảo thủ: trình tự vùng ITS của rDNA, trình tự gen β-tubulin (*benA*) và gen calmodulin (*CaM*). Kể từ năm 2012, trình tự vùng ITS được chấp nhận là mã vạch DNA chính thức dùng cho phân loại nấm. Tuy nhiên, trình tự vùng ITS không đủ để xác định chính xác tất cả các loài nấm thuộc chi *Aspergillus* và do đó, cần phải có các marker thứ cấp để phân loại. Vì lý do này, calmodulin, β-tubulin hoặc tiêu đơn vị lớn thứ hai RNA polymerase II (*rpb2*) đã được đề xuất làm các marker thứ cấp. Gen *rpb2* không dễ khuếch đại, khiến việc sử dụng nó như một marker thứ cấp tương đối khó khăn đối với một số loài nấm. Gen *benA* rất dễ khuếch đại, nhưng đã được báo cáo là có sự khác nhau về số lượng intron và đôi khi thực hiện phản ứng PCR dẫn đến việc khuếch đại các gen paralogous [15]. Mặt khác, *CaM* rất dễ khuếch đại và có thể dùng để phân biệt giữa hầu hết tất cả các loài nấm thuộc chi *Aspergillus*. Ngoài ra, cơ sở dữ liệu về trình tự *CaM* gần như hoàn chỉnh cho tất cả các loài được chấp nhận. Nói chung, để có thể xác định chính xác loài thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium*, các gen *benA* và *CaM* thường được lựa chọn để có thể cung cấp các thông tin tốt hơn [14]. Thông tin về trình tự ITS, *benA* và *CaM* được so sánh với dữ liệu trên GenBank. Các thông tin thu được đã cho phép xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 1C).

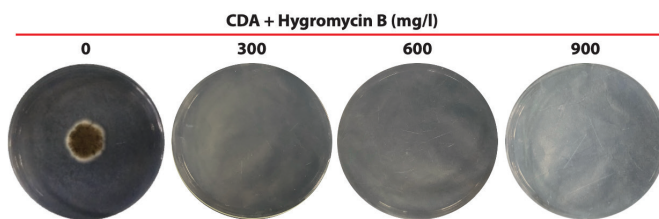


Hình 1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc sinh bào tử và định danh chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 dựa trên trình tự vùng ITS, gen *benA* và *CaM*. (A) Hình thái chủng nấm AL1 nuôi cấy trên CYA sau 4 ngày ở 30°C và cấu trúc sinh bào tử quan sát dưới kính hiển vi; (B) Kết quả khuếch đại vùng ITS, gen *benA* và *CaM* nhờ PCR của chủng AL1; (C) Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự của vùng ITS, gen *benA* và *CaM*. M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

Kết quả cho thấy nấm AL1 là *A. luchuensis* với độ tương đồng là 100%. Trước đây, *A. luchuensis* được gộp chung vào *A. niger*. Tuy nhiên, đến năm 2014, *A. luchuensis* (cũng từng được đặt tên là *A. awamori*) được tách ra [13].

3.2. Chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 miễn cảm với kháng sinh hygromycin B

Kháng sinh hygromycin B được lựa chọn để sử dụng cho chuyển gen vào nấm *A. luchuensis*. Khả năng sinh trưởng của chủng nấm *A. luchuensis* AL1 trên môi trường với các nồng độ kháng sinh hygromycin B: 0, 300, 600, 900 mg/l đã được đánh giá nhằm lựa chọn nồng độ kháng sinh thích hợp cho chuyển gen. Kể từ nồng độ 300 mg/l, chủng *A. luchuensis* AL1 bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn (hình 2).



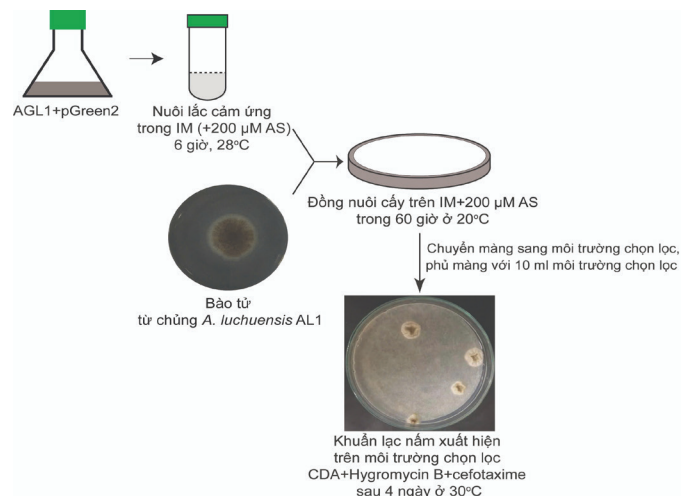
Hình 2. Mức độ miễn cảm của *Aspergillus luchuensis* AL1 với kháng sinh hygromycin B. Chủng *Aspergillus luchuensis* AL1 được nuôi trên CDA bổ sung hygromycin B với các nồng độ (0, 300, 600 và 900 mg/l) trong 5 ngày ở 30°C.

Hygromycin B là một trong những kháng sinh phổ biến trong các nghiên cứu chuyển gen vào cả thực vật và nấm. Hygromycin B (HmB) được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* và *Escherichia coli* là kháng sinh thường được sử dụng nhằm ức chế quá trình sinh tổng hợp polypeptide bằng cách cố định tRNA-ribosomal và ức chế dịch mã [16]. Cassette kháng kháng sinh hygromycin B bắt nguồn từ vector pAN7-1 được sử dụng rộng rãi cho chuyển gen vào nấm sợi. Cassette này chứa trình tự của vùng promoter từ nấm *A. nidulans* glyceraldehyde dehydrogenase (*gpdA*), khung đọc mở của gen kháng kháng sinh hygromycin B và vùng terminator anthranilate synthase (*trpC*) [17]. Vector pGreen2 cung cấp bởi phòng Genomic dùng cho chuyển gen cũng có cassette kháng kháng sinh hygromycin B tương tự (hình 4B).

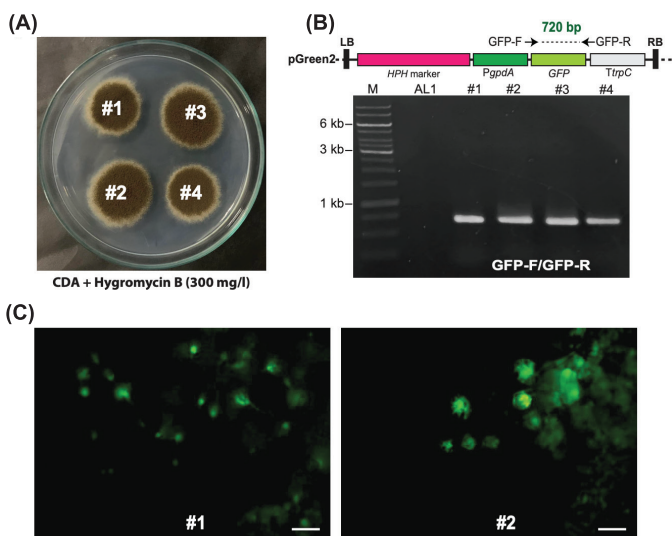
Nồng độ kháng sinh hygromycin B dùng cho chọn lọc các thể chuyển gen đối với nấm sợi *A. niger* dao động từ 300-900 mg/l, tùy thuộc vào khả năng miễn cảm với kháng sinh của chủng nấm khảo sát [6, 18]. 300 mg/l cũng là nồng độ kháng sinh hygromycin B được sử dụng cho chuyển gen vào nấm *Colletotrichum gloeosporioides* [19]. Trong nghiên cứu này, chủng nấm AL1 bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn khi 300 mg/l kháng sinh hygromycin B được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Như vậy, 300 mg/l là nồng độ hygromycin B được sử dụng để nghiên cứu chuyển gen vào *A. luchuensis* AL1.

3.3. Chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Quá trình chuyển cấu trúc biểu hiện protein huỳnh quang xanh GFP vào nấm *A. luchuensis* được mô tả như trong hình 3. Sau 4 ngày ở 30°C, 4 khuẩn lạc đã quan sát được trên màng giấy lọc (hình 3). Các khuẩn lạc này sau đó được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung kháng sinh hygromycin B (300 mg/l) và cả 4 thể chuyển gen này đều kháng kháng sinh hygromycin B (hình 4A).



Hình 3. Sơ đồ chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp ATMT.



Hình 4. Chuyển gen huỳnh quang vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1. (A) Sàng lọc các thể chuyển gen trên môi trường CDA bổ sung hygromycin B (300 mg/l); (B) Sơ đồ vùng T-DNA của vector pGreen2, vị trí bám mỗi GFP-F/GFP-R và xác nhận các thể chuyển gen nhờ PCR với cặp mồi GFP-F/GFP-R; (C) Sự biểu hiện của protein huỳnh quang xanh GFP ở các chủng chuyển gen; M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

Sau khi đồng nuôi cấy vi khuẩn và nấm trong 60 giờ ở 22°C, màng giấy lọc được chuyển sang môi trường CDA có bổ sung kháng sinh hygromycin B (300 mg/l) và một lớp mỏng môi trường chọn lọc có kháng sinh hygromycin B được phủ lên màng giấy lọc (phủ màng) nhằm hạn chế hiện tượng dương tính giả. Ở nấm sợi *A. niger*, khi tiến hành chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B, một số thể chuyển gen xuất hiện trên màng chuyển gen nhưng không thể sinh trưởng được khi sàng lọc trên môi trường có bổ sung hygromycin B [6]. Việc bổ sung thêm một lượng môi trường lên trên màng giấy lọc đã giúp chọn lọc các thể chuyển gen và ức chế hiện tượng dương tính giả ở nấm *A. niger*. Hiệu suất chuyển gen khi tiến hành phủ màng tăng lên từ 10-20 lần ở *A. niger* [18]. Trong nghiên cứu này, hiệu quả chuyển gen ở nấm *A. luchuensis* đạt 40 thể chuyển gen/10⁶ bào tử và tất cả các thể chuyển gen xuất hiện trên màng đều kháng kháng sinh hygromycin B, không thấy xuất hiện hiện tượng dương tính giả (hình 4A).

Bên cạnh đó, hiệu quả chuyển gen vào nấm sử dụng phương pháp ATMT phụ thuộc vào nhiều yếu tố, chẳng hạn như vật chủ, chủng *Ag. tumefaciens*, nồng độ AS, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi cấy... AS được sử dụng để kích thích quá trình cảm ứng các gen *vir* và kích hoạt quá trình chuyển T-DNA. Vì vậy, nồng độ AS có ảnh hưởng rất lớn đối với hiệu quả chuyển gen ở nhiều loài nấm và nồng độ AS tối ưu khác biệt ở các chủng nấm [20, 21]. Nếu không bổ sung AS trong quá trình chuyển gen ở nấm *Aspergillus terreus* thì hiệu quả chuyển gen rất thấp hoặc chuyển gen không thành

công [18]. Lượng AS là một trong các nhân tố đóng vai trò quyết định tới số lượng các thể chuyển gen đối với loài nấm *A. awamori* [22]. Trong một số nghiên cứu chuyển gen hiệu quả cao ở nấm *A. niger*, *A. oryzae* trước đó, 200 μM được lựa chọn là nồng độ AS trong môi trường đồng nuôi cấy và hiệu quả chuyển gen có thể đạt 1060±143 thể chuyển gen cho 10⁶ bào tử [6, 7, 23]. Một số thông số như đồng nuôi cấy ở 22°C, đồng nuôi cấy trong 60 giờ đã được xác định là các thông số tối ưu cho chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT ở *A. niger* khuyết dưỡng histidine [7]. Ngoài ra, sử dụng vector pGreen2 cho chuyển gen vào nấm *A. niger* cho hiệu quả chuyển gen đạt 87±18 thể chuyển gen/10⁶ bào tử [6]. Áp dụng các thông số cho chuyển gen với nấm *A. niger* để thực hiện cải biến di truyền ở loài nấm sợi *A. luchuensis*, hiệu quả chuyển gen đạt tới 40 thể chuyển gen/10⁶ bào tử.

Các thể chuyển gen xuất hiện trên màng giấy lọc được kiểm tra sự có mặt của gen mã hoá protein huỳnh quang GFP thông qua PCR. Có thể quan sát thấy sản phẩm 720 bp ở tất cả các thể chuyển gen, tương ứng với kích thước của gen GFP (hình 4A). Sự biểu hiện của protein GFP trong hệ sợi và bào tử nấm được đánh giá bằng cách quan sát các thể chuyển gen này dưới kính hiển vi huỳnh quang (hình 4C). Tín hiệu rõ ràng màu xanh lá cây đã khẳng định rằng gen mã hoá protein huỳnh quang GFP đã được tích hợp vào hệ gen của nấm *A. luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B.

Sự tích hợp ngẫu nhiên T-DNA nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* vào hệ gen nấm đã được ứng dụng để xác định, phân lập các đột biến với các kiểu hình mong muốn, từ đó khám phá được chức năng gen hoặc dùng để sàng lọc các chủng có đặc tính tốt phục vụ cho sản xuất công nghiệp một số sản phẩm có giá trị kinh tế. Thông qua việc gây đột biến chèn ngẫu nhiên, có thể thu được các thể đột biến *Penicillium digitatum* không gây bệnh hoặc giảm độc tính trên quả có múi, hoặc các chủng tăng sản xuất chitinase ở nấm *Purpureocillium lilacinum* [24, 25]. Các thể chuyển gen *A. luchuensis* tạo ra trong nghiên cứu này sẽ tiếp tục được kiểm tra các đặc tính chống chịu stress, khả năng sinh enzyme, khả năng phân giải các hợp chất...

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, việc chuyển gen vào chủng nấm sợi thực phẩm *A. luchuensis* AL1 với phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Ag. tumefaciens* đã bước đầu thành công. Hiệu suất chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1 đạt 40 thể chuyển gen/10⁶ bào tử và không có hiện tượng khuẩn lạc dương tính giả khi sử dụng marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Nghiên cứu cũng xác nhận sự hiệu quả của promoter *gpdA* từ *A. nidulans* trong điều hòa biểu hiện gen huỳnh quang GFP cung cấp ở nấm sợi *A. luchuensis*. Các chủng chuyển gen GFP cho tín hiệu huỳnh quang xanh rõ ràng ở toàn hệ sợi nấm khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan của hãng Carl Zeiss, Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Hayashi, Y. Kajiwara, T. Futagami, et al. (2021), "Making traditional Japanese distilled liquor, shochu and awamori, and the contribution of white and black koji fungi", *Journal of Fungi*, **7(7)**, DOI: 10.3390/jof7070517.
- [2] J.M. Mogensen, J. Varga, U. Thrane, et al. (2009), "*Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2", *International Journal of Food Microbiology*, **132(2-3)**, pp.141-144, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.011.
- [3] S.B. Hong, M. Lee, D.H. Kim, et al. (2013), "*Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia", *PLOS ONE*, **8(5)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0063769.
- [4] C. Kadooka, M. Yamaguchi, K. Okutsu, et al. (2020), "A CRISPR/Cas9-mediated gene knockout system in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **84(10)**, pp.2179-2183, DOI: 10.1080/09168451.2020.1792761.
- [5] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J.V.D. Hondel, et al. (2005), "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi", *Current Genetics*, **48(1)**, pp.1-17, DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0.
- [6] H.D. Thai, M.T. Trinh, L.T.B.X. Do, et al. (2024), "Gene function characterization in *Aspergillus niger* using a dual resistance marker transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", *Journal of Microbiological Methods*, **224**, DOI: 10.1016/j.mimet.2024.106989.
- [7] H.D. Thai, L.T.B.X. Do, X.T. Nguyen, et al. (2023), "A newly constructed *Agrobacterium*-mediated transformation system based on *hisB* auxotrophic marker for genetic manipulation in *Aspergillus niger*", *Archives of Microbiology*, **205**, DOI: 10.1007/s00203-023-03530-y.
- [8] S.G. Jin, T. Komari, M.P. Gordon, et al. (1987), "Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium-tumefaciens* A281", *Journal of Bacteriology*, **169(10)**, pp.4417-4425, DOI: 10.1128/jb.169.10.4417-4425.1987.
- [9] T.K. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, et al. (2016), "The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.
- [10] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18(1)**, pp.315-322.
- [11] N.L. Glass, G.C. Donaldson (1995), "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes", *Applied and Environmental Microbiology*, **61(4)**, pp.1323-1330, DOI: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.
- [12] S.B. Hong, S.J. Go, H.D. Shin, et al. (2005), "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species", *Mycologia*, **97(6)**, pp.1316-1329, DOI: 10.3852/mycologia.97.6.1316.
- [13] S.B. Hong, O. Yamada, R.A. Samson (2014), "Taxonomic re-evaluation of black koji molds", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, pp.555-561, DOI: 10.1007/s00253-013-5332-9.
- [14] R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbroken, et al. (2014), "Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*", *Studies in Mycology*, **78**, pp.141-173, DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- [15] S.W. Peterson (2008), "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci", *Mycologia*, **100(2)**, pp.206-226, DOI: 10.3852/mycologia.100.2.205.
- [16] P.J. Punt, C.A.V.D. Hondel (1992), "Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers", *Methods in Enzymology*, **216**, pp.447-457, DOI: 10.1016/0076-6879(92)16041-h.
- [17] P.J. Punt, R.P. Oliver, M.A. Dingemans, et al. (1987), "Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*", *Gene*, **56(1)**, pp.117-124, DOI: 10.1016/0378-1119(87)90164-8.
- [18] S.M. Park (2001), "Improved transformation of the filamentous fungus *Aspergillus niger* using *Agrobacterium tumefaciens*", *Mycobiology*, **29(3)**, pp.132-134, DOI: 10.1080/12298093.2001.12015774.
- [19] T.X. Vu, T.B. Tran, M.B. Tran, et al. (2023), "Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains", *Heliyon*, **9(2)**, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13663.
- [20] D. Li, Y. Tang, J. Lin, et al. (2017), "Methods for genetic transformation of filamentous fungi", *Microbial Cell Factories*, **16**, DOI: 10.1186/s12934-017-0785-7.
- [21] D. Wang, D. He, G. Li, et al. (2014), "An efficient tool for random mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*", *Journal of Microbiological Methods*, **98**, pp.114-118, DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.007.
- [22] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J.V.D. Hondel, et al. (2008), "*Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*", *Nature Protocols*, **3(10)**, pp.1671-1678, DOI: 10.1038/nprot.2008.154.
- [23] T.K. Nguyen, N.Q. Ho, T.B.X.L. Do, et al. (2017), "A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33(6)**, DOI: 10.1007/s11274-017-2275-9.
- [24] X.T. Vu, T.T. Ngo, T.D.L. Mai, et al. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.
- [25] C.T. Binh, H.D. Thai, B.T.V. Ha, et al. (2021), "Establishment of a new and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system in the nematocidal fungus *Purpureocillium lilacinum*", *Microbiological Research*, **249**, DOI: 10.1016/j.micres.2021.126773.