

## NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN GUS VÀO KHOAI LANG THÔNG QUẠ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Vũ Thị Lan<sup>1,2</sup>, Mai Thị Phương Nga<sup>1,3</sup>, Nguyễn Trung Nam<sup>2</sup>, Lê Thu Ngọc<sup>1</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>, Lê Trần Bình<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup> Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen vào khoai lang thông qua *Agrobacterium* sử dụng glucuronidase (*gus*) làm gen chỉ thị đã được tối ưu. Các yếu tố chuyển gen được tối ưu bao gồm mật độ vi khuẩn, nồng độ Acetosyringone, vật liệu thực vật dùng làm thể nhận gen, thời gian nhiễm khuẩn, nồng độ chất chọn lọc kanamycin. Kết quả ở điều kiện tối ưu: mảnh cây từ đỉnh ngọn được nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* C58 ở nồng độ  $OD_{600nm} = 0,8$ , bổ sung Acetosyringone 150  $\mu M$  trong 20 - 30 phút, thu được tỉ lệ biểu hiện tạm thời gen *gus* cao nhất (38%). Mô sẹo chuyển gen được chọn lọc trên môi trường CP3 bổ sung cefotaxim 500 mg/l, kanamycin 50 mg/l trong 3 - 4 tuần. Chồi tái sinh từ các mô sẹo sống sót được chọn lọc tiếp trên môi trường ra rễ MS bổ sung kanamycin 100 mg/l. Kết quả ban đầu về chuyển gen *gus* vào giống khoai lang KB1 là hầu hết các dòng mô sẹo sống sót đều biểu hiện hoạt động gen *gus* (có màu xanh chàm rất đậm) và thu được 8/21 dòng cây khoai lang chuyển gen *gus* ra rễ trên môi trường chọn lọc bổ sung kanamycin 50 mg/l. Những kết quả này đã tạo tiền đề thuận lợi cho chúng tôi tiến hành những nghiên cứu tạo giống khoai lang chuyển gen kháng bọt hà.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển gen, gen *gus*, giống KB1, *Ipomoea batatas* L.

### MỞ ĐẦU

Khoai lang (*Ipomoea batatas* (L) Lam) thuộc họ Convolvulaceae, chi *Ipomoea* là cây lương thực quan trọng đứng thứ bảy trên thế giới sau lúa mì (*Triticum aestivum*), lúa (*Oryza sativa*), ngô (*Zea mays*), lúa mạch (*Hordeum vulgare*), khoai tây (*Solanum tuberosum*) và sắn (*Manihot esculenta* Crantz). Ở Việt Nam, khoai lang cũng được xem là cây lương thực quan trọng chỉ sau lúa, ngô, sắn. Khoai lang cung cấp lượng tinh bột lớn, là nguồn lương thực có giá trị cho người và động vật. Ngoài ra, khoai lang còn được dùng làm nguyên liệu chế biến rượu, cồn, xi rô, nước giải khát, bánh kẹo, mì, miến, phụ gia thực phẩm, mangan phủ sinh học. Tuy nhiên năng suất của khoai lang bị suy giảm đáng kể do sự tàn phá không chỉ của các yếu tố tự nhiên mà còn của các tác nhân sinh học như: nấm, sâu bệnh trong đó bọt hà (*Cylas formicarius*) là tác nhân nguy hiểm nhất gây thiệt hại về năng suất tới 60 - 100%.

Với sự phát triển mạnh của công nghệ sinh học, các nhà khoa học đã ứng dụng thành công các hệ thống chuyển gen khác nhau để chuyển gen mong muốn vào khoai lang như: chuyển gen nhờ xung điện vào protoplast, chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes*, súng bắn gen. Tuy nhiên, phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* thu được hiệu quả cao hơn cả do có được một số lợi thế vượt trội như: quy trình chuyển gen đơn giản với chi phí thấp, có khả năng chuyển được một đoạn gen có kích thước lớn vào tế bào thực vật mà không làm thay đổi vị trí gen, chèn vào vị trí xác trong genom tế bào chủ chỉ với một vài bản sao. Chính vì vậy có rất nhiều nghiên cứu đã sử dụng thành công phương pháp này (Yu et al., 2007; Yang et al., 2011). Tuy nhiên, hầu hết các kết quả thu được lần sử chuyển gen còn thấp và phụ thuộc nhiều vào kiểu gen, chỉ thành công trên một vài giống nhất định. Do đó cần phải có các nghiên cứu tối ưu các điều kiện của quy trình chuyển gen ở khoai lang nhằm xây dựng một quy trình hiệu quả cho giống khoai lang cụ thể nghiên cứu (Yu et al., 2007; Gonzalez et al., 2008; Xing et al., 2007). Trong hầu hết các nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen ở khoai lang, gen *gus* là gen chỉ thị mã hóa cho enzyme glucuronidase được sử dụng phổ biến vì nó là dấu hiệu thuận lợi để nhận thấy được sự biểu hiện gen cũng như vị trí biểu hiện gen trong các mô và thực vật chuyển gen (Jefferson et al., 1987). Trong bài báo này chúng tôi thông báo kết quả nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen *gus* vào khoai lang thông qua *Agrobacterium tumefaciens* vào giống khoai lang có chất lượng tốt được trồng phổ biến ở miền Trung Việt Nam là KB1 sử dụng gen glucuronidase (*gus*) là gen chỉ thị.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu nghiên cứu

Các vật liệu khác nhau bao gồm: đỉnh ngọn, củ sống, mảnh lá, đoạn thân của hai giống khoai lang Hoàng Long, KB1 do Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Chúng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen pCB-Gusplus được cung cấp bởi phòng Công nghệ tế bào thực vật. Vùng T-DNA mang gen chỉ thị *gus* (glucuronidase) được điều khiển bởi promoter Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) và gen *nptII* (neomycin phosphotransferase) được điều khiển bởi promoter nopaline synthase (*Nos* promoter).

#### Phương pháp nghiên cứu

##### Nuôi dịch huyền phù vi khuẩn:

Cây trái *A. tumefaciens* C58 cắt giữ trong glycerol lên đĩa môi trường LB đặc bổ sung kanamycin 50 mg/l, rifamycin 50 mg/l, chloramphenicol 50 mg/l, nuôi ở 28°C trong 48 - 96 giờ. Sau đó lấy một khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng (bổ sung kháng sinh phù hợp) ở 28°C, lắc ở tốc độ 220 vòng/phút trong 16-18 giờ. Dịch vi khuẩn được nuôi hoạt hóa trên môi trường LB lỏng không có kháng sinh ở 28°C, lắc 220 vòng/phút từ 3 - 5 giờ cho tới  $OD_{600} \approx 0,8 - 1,0$ . Dịch huyền phù vi khuẩn được ty tâm với tốc độ 4500 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút để thu cặn tế bào và hòa tan trong môi trường 1/2 MS và pha loãng cho tới  $OD_{600}$  phù hợp.

**Nghiên cứu một số điều kiện chuyển gen thông qua chuyển gen *gus*.**

Vật liệu biến nạp nghiên cứu gồm đoạn trần, cuống lá, đỉnh ngọn (bạc gồm mảnh lá thứ nhất), mảnh lá thứ 2 và 3 được cắt nhỏ 0,3 - 0,5 cm được bỏ vào đĩa petri ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn ở 3 nồng độ OD<sub>600nm</sub> (0,6; 0,8; 1,0) bổ sung chất dẫn dụ vi khuẩn Acetosyringone với các nồng độ 100 μM, 150 μM, 200 μM trong hai khoảng thời gian là 20 phút và 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi nhiễm khuẩn các mảnh vật liệu được chuyển lên giấy thấm khử trùng thấm cho hết nước rồi cấy chuyển lên môi trường nuôi cấy (CP3) trong 2 ngày.

Phân tích sự biểu hiện tạm thời của gen *gus*: Mẫu biến nạp sau thời gian đồng nuôi cấy được thu ngẫu nhiên mỗi đĩa 10 - 20 mẫu, đem nhuộm với dung dịch X-gluc (Jefferson et al., 1987). Mẫu biểu hiện *gus* dương tính là mẫu có màu xanh chàm. Hiệu quả chuyển gen được tính là tỉ lệ phần trăm mẫu biểu hiện dương tính khi nhuộm *gus*.

**Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên môi trường chọn lọc**

Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên môi trường chọn lọc mô sẹo: đỉnh ngọn và mảnh lá cây lên môi trường tạo mô sẹo CP3 (CP bổ sung picloram 0,5 mg/l) và bổ sung kanamycin (Km) với các nồng độ 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200 mg/l. Theo dõi tỉ lệ cảm ứng mô sẹo (sau 7 ngày) và tỉ lệ tạo mô sẹo (sau 15 ngày), tỉ lệ sống sót của mô sẹo (sau 30 đến 60 ngày). Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên môi trường chọn lọc chồi: Nguyên liệu là các chồi non *in vitro* mới tái sinh cao khoảng 1-1,5 cm. Xác định ngưỡng sống sót của chồi trên môi trường chọn lọc là môi trường MS bổ sung kanamycin với các nồng độ 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200 mg/l.

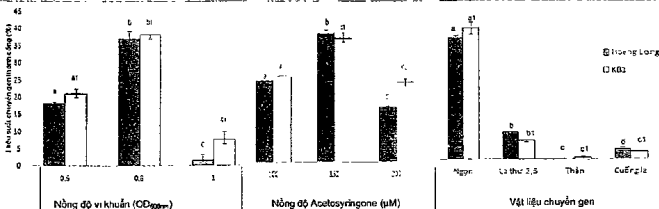
**Chuyển gen *gus* vào giống khoai lang KB1:**

Tiến hành chuyển gen *gus* vào giống khoai lang KB1 theo quy trình tái sinh và chuyển gen đã tối ưu: Cắt nguyên liệu thành các mẫu có kích thước khoảng 0,3 cm (đối với đỉnh ngọn) hoặc 0,3x0,3 cm (đối với mảnh lá); Nguyên liệu đã cắt nhỏ được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* (OD<sub>600nm</sub>=0,8) đã chuẩn bị trong khoảng thời gian 30 phút; Mẫu đã nhiễm khuẩn cấy lên môi trường đồng nuôi cấy trong khoảng 2 - 3 ngày; Rửa khuẩn và chuyển mẫu lên môi trường chọn lọc mô sẹo CP3 bổ sung 50 mg/l kanamycin, 500 mg/l cefotaxime, nuôi 3 - 4 tuần; Các mô sẹo sống sót trên môi trường chọn lọc, cấy chuyển lên môi trường tái sinh là môi trường MS bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng phù hợp để tái sinh chồi; Chồi tái sinh được chọn lọc trên môi trường ra rễ MS bổ sung kanamycin 100 mg/l.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn, nồng độ Acetosyringone và vật liệu thực vật**

Hiệu quả chuyển gen *gus* thông qua *Agrobacterium tumefaciens* vào khoai lang phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống khoai lang, chủng vi khuẩn, kích thước và loại nguyên liệu thực vật nhiễm khuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của một số các yếu tố cơ bản như: nồng độ vi khuẩn, nồng độ chất cảm ứng Acetosyringone và vật liệu dùng để chuyển gen của hai giống khoai lang có chất lượng tốt được trồng phổ biến ở miền Trung là KB1 và Hoàng Long (Hình 1). Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả chuyển gen đối với giống khoai lang Hoàng Long, KB1 thu được cao nhất (38%) tại nồng độ vi khuẩn khi OD<sub>600nm</sub> = 0,8. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu giống khoai lang Xu5-2, là một giống thích nghi tốt với khí hậu cũng như địa chất ở Trung Quốc (Xing et al., 2007). Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu khác, nồng độ vi khuẩn OD<sub>600nm</sub> = 0,5 thích hợp cho chuyển gen vào phiến tạo ra từ mô sẹo khoai lang (Yu et al., 2007).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn, nồng độ Acetosyringone, vật liệu chuyển gen đến hiệu suất chuyển gen *gus* ở giống khoai lang Hoàng Long, KB1 (Các chữ cái a, b, c, d, a1, b1, c1 chỉ các hiệu quả khác nhau có ý nghĩa thống kê với p < 0,05; sai số chuẩn chỉ sự dao động của giá trị trung bình, n=3)

Đối với ảnh hưởng của Acetosyringone (AS), ở nồng độ 150 μM hiệu suất chuyển gen vào hai giống khoai lang Hoàng Long và KB1 là cao nhất (khoảng 35%). Hiệu suất chuyển gen thu được thấp hơn ở nồng độ AS là 100 μM và 200 μM. Theo một số các nghiên cứu cho thấy nồng độ AS phù hợp là khác nhau trong các quy trình chuyển gen ở khoai lang và đường như phụ thuộc vào kiểu gen. Nồng độ AS được sử dụng là 10 mg/l (Otoni et al., 1998) hoặc 30 μM (Yu et al., 2007). Gonzalez và đồng tác giả (2008) cho thấy có mối quan hệ mật thiết giữa ảnh hưởng của AS và nhiệt độ nuôi cấy khi nghiên cứu ở hai giống khoai lang Jewel và CEMSA 78354, không có sự khác biệt giữa không và có bổ sung AS ở 22°C, ở 25°C thì bổ sung AS từ 2 đến 4 mg/l làm tăng hiệu quả chuyển gen, còn ở nhiệt độ phòng 28°C thì không bổ sung AS hiệu quả chuyển gen đạt cao nhất. Đối với ảnh hưởng của vật liệu biến nạp, chúng tôi thu được kết quả hiệu suất chuyển gen thông qua biểu hiện tạm thời gen *gus* cao nhất khi sử dụng ngọn hay đỉnh sinh trưởng làm vật liệu chuyển gen (khoảng 32%). Hiệu suất chuyển gen thu được thấp hơn khi sử dụng vật liệu là thân, cuống lá và các mảnh

lá thứ hai, ba. Kết quả này phù hợp với nhiều các nghiên cứu chuyển gen thông qua phát sinh phối soma đã công bố (Xing et al., 2007; Yang et al., 2011).

**Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến hiệu quả chuyển gen**

Thời gian nhiễm khuẩn là một yếu tố rất quan trọng trong quá trình biến nạp, phụ thuộc vào loài thực vật và loại mô. Nó phải đủ để cho mẫu thực vật và vi khuẩn tiếp xúc, vi khuẩn có cơ hội xâm nhập và chuyển gen. Tuy nhiên, thời gian lây nhiễm dài sẽ ảnh hưởng tới sức sống của mẫu. Kết quả nghiên cứu với hai khoảng thời gian nhiễm khuẩn khác nhau là 20 phút và 30 phút (Bảng 1) cho thấy khả năng tạo mô sẹo của mẫu biến nạp có sự khác biệt đáng kể, khi nhiễm khuẩn 20 phút tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 16,4%, còn đối với mẫu nhiễm khuẩn 30 phút tỉ lệ tạo mô sẹo đạt cao hơn (35,57%). Sau 20 ngày, chúng tôi tiến hành lấy ngẫu nhiên mỗi đĩa 3 khối mô sẹo (5 đĩa) đem nhuộm với cơ chất X-gluc. Kết quả cho thấy, tỉ lệ gus dương tính của hai lô thí nghiệm là khá cao, đạt 40%. Các mô sẹo biểu hiện gus là các vùng mô có màu xanh đậm. Do vậy, thời gian nhiễm khuẩn từ 20 đến 30 phút là phù hợp cho các thí nghiệm chuyển gen vào khoai lang. Theo một số các nghiên cứu chuyển gen trên thế giới thì thời gian nhiễm khuẩn rất khác nhau, các nguyên liệu mô sẹo được nhiễm khuẩn trong khoảng thời gian phù hợp là từ 10 đến 20 phút (Yang et al., 2011; Xing et al., 2007).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến hiệu quả chuyển gen**

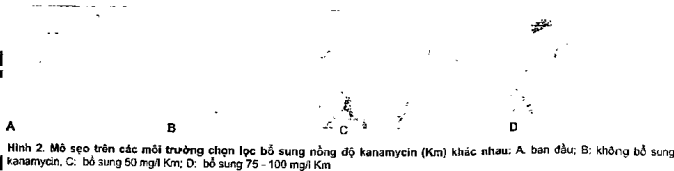
Thời gian nhiễm khuẩn (phút)	Số mảnh cây (cái)	Tỉ lệ cảm ứng mô sẹo (%) sau 15 ngày	Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỉ lệ gus dương tính (%)
20 phút	146	100 ± 0	16,4 ± 3,5	40
30 phút	149	100 ± 0	35,57 ± 4,7	40

**Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên các môi trường chọn lọc:**

Gen chọn lọc *npt II* kháng kanamycin (Km) thường được thiết kế trong các vector dùng để chuyển gen ở thực vật. Tuy nhiên, mức độ miễn cảm của mô thực vật với Km thay đổi nhiều phụ thuộc vào giống, loài thực vật. Kanamycin tác động tới các tế bào không chuyển gen theo cơ chế liên kết với tiểu phần nhỏ của ribosome trong tế bào, ức chế quá trình sinh tổng hợp protein và các con đường sinh tổng hợp khác liên quan, trong đó có hoạt động của lục lạp. Mảnh lá, cụm chồi, cây mắt khả năng hấp thu dinh dưỡng, hoạt động của lục lạp bị rối loạn nên sẽ bị vàng và chết dần. Vì vậy, kanamycin được dùng rộng rãi như một marker chọn lọc các tế bào, mảnh lá, cây chuyển gen qua các giai đoạn.

**Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên môi trường chọn lọc mô sẹo:** Trên môi trường CP3 bổ sung Km với nồng độ khác nhau từ 0 - 200 mg/l đã có ảnh hưởng khác biệt rõ rệt đến khả năng cảm ứng mô sẹo và tỉ lệ tạo mô sẹo (Bảng 2). Sự cảm ứng của mẫu sau 7 ngày ở các nồng độ Km từ 0 - 75 mg/l là khá cao (73 - 100%). Tỉ lệ này giảm rõ rệt khi bổ sung nồng độ Km từ 100 - 200 mg/l và chỉ đạt 36,56 - 39,40%. Các mẫu là được cảm ứng có màu xanh, mô sẹo sùi quanh mép cắt, còn mẫu thân thì phồng, xốp và hơi đen. Đặc điểm này giống với mô sẹo trên môi trường đối chứng không bổ sung Km. Sau 15 ngày, trên các môi trường bổ sung Km với nồng độ khác nhau đã có sự khác biệt đáng kể về khả năng tạo mô sẹo. Tỉ lệ tạo mô sẹo giảm dần khi bổ sung Km tăng lên từ 25 - 50 mg/l, giảm từ 89% xuống còn 71,25%, môi trường bổ sung Km 75 và 100 mg/l, tỉ lệ tạo mô sẹo giảm rõ rệt chỉ còn đạt 43,35% và 6,5%. Tuy nhiên, mô sẹo chỉ là các hạt nhỏ li ti, màu trắng phủ quanh mép lá, còn đối với mẫu đỉnh ngọn thì phồng, xốp và vàng nhạt. Khi bổ sung Km từ 150 - 200 mg/l, các mẫu cây hầu như mẫu không tạo được mô sẹo, mẫu cây khô dần và chết. Sau 30 ngày nuôi cấy, tỉ lệ mô sẹo sống sót trên các môi trường chọn lọc bổ sung Km 50 mg/l và 75 mg/l, 100 mg/l là rất thấp, chỉ còn đạt lần lượt là 8,5% và 3,0% và 0%, trong khi trên môi trường đối chứng (0 mg/l Km), tỉ lệ này đạt 100%.

Từ các kết quả ban đầu này, chúng tôi lựa chọn môi trường bổ sung Km với ba nồng độ 50, 75, 100 mg/l để nghiên cứu chọn lọc mô sẹo chuyển gen (Hình 2 và Bảng 3). Kết quả khi theo dõi sự sinh trưởng và sống sót của mô sẹo sau thời gian dài hơn (sau 30 đến 60 ngày) cho thấy bổ sung Km nồng độ từ 50 đến 100 mg/l vào môi trường chọn lọc đã có ảnh hưởng khác biệt rõ rệt đến khả năng sống sót của mô sẹo. Khi chọn lọc trên môi trường bổ sung Km 50 mg/l (lô thí nghiệm 1), sau 15 ngày nuôi cấy, các mảnh cây đều tươi, màu vàng sáng, mô sẹo hình thành xung quanh mẫu cây, tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 65,5%. Sau 4 tuần nuôi cấy, có 65 mô sẹo sống sót (30%), các mô sẹo này được chuyển sang các môi trường tái sinh chồi. Khi chọn lọc mô sẹo trên môi trường bổ sung Km 75 mg/l, sau 15 ngày nuôi cấy các mảnh cây cũng rất tươi, màu vàng sáng giống như lô thí nghiệm 1, tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 37,6%. Tuy nhiên, sau 4 - 5 tuần nuôi cấy, toàn bộ mô sẹo hình thành bị đen thẫm và chết. Khi chọn lọc trên môi trường bổ sung Km 100 mg/l sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo hình thành nhưng không phát triển tiếp, mẫu thẫm đen và 100% mô bị chết. Đối với nghiên cứu chuyển gen vào khoai lang thông qua phối soma hoặc mô sẹo thì ảnh hưởng của Km đến khả năng tạo mô sẹo và sống sót của mô sẹo là đặc biệt quan trọng, vì vậy chúng tôi lựa chọn ngưỡng nồng độ Km là 50 mg/l. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu khác (Luo et al., 2006), tuy nhiên, là khá cao so với nghiên cứu sử dụng nồng độ Km 10 mg/l để chọn lọc các mô sẹo kháng ở giống khoai lang Xu55-2 (Xing et al., 2008).



**Bảng 2. Ảnh hưởng của kanamycin đến khả năng sống sót của mô sẹo trên môi trường chọn lọc**

Kanamycin (mg/l)	Tỉ lệ cảm ứng mô sẹo (%) sau 7 ngày	Tỉ lệ tạo mô sẹo (%) sau 15 ngày	Tỉ lệ mô sẹo sống sót (%) sau 30 ngày	Đặc điểm của mẫu
0 (ĐC)	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	Phòng, xấp, đen
25	96,00 ± 5,66	89,00 ± 5,66	57,14 ± 5,0	Phòng, xấp, đen
50	73,95 ± 4,17	71,25 ± 8,41	8,5 ± 2,5	Phòng, xấp, đen
75	73,95 ± 0,85	43,35 ± 3,04	3,0 ± 2,0	Phòng, xấp, vàng nhạt
100	39,40 ± 0,35	6,50 ± 0,28	0	Xốp, trắng
150	38,75 ± 4,74	0	0	Không phòng, cứng, trắng
200	36,65 ± 5,44	0	0	Không phòng, cứng, trắng

**Bảng 3. Ảnh hưởng của kanamycin đến sự sống sót của mô sẹo chuyển gen sau 60 ngày**

Lô thí nghiệm	Nồng độ Km (mg/l)	Số mẫu cây (cái)	Số mẫu cảm ứng tạo mô sẹo (cái)	Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)	Số mô sẹo sống sót (cái)	Tỉ lệ mô sẹo sống sót (%)
1	50	210	210	65,50	65	30
2	75	143	143	37,06	0	0
3	100	588	554	0	0	0

**Xác định ngưỡng nồng độ kanamycin trên môi trường chọn lọc chồi**

Kết quả nghiên cứu (Bảng 4) cho thấy đỉnh ngon của cây khoai lang *in vitro* có khả năng kháng tự nhiên với Km khá mạnh. Ở môi trường đối chứng (0 mg/l Km), 100% mẫu tạo rễ, các rễ to và dài, phân nhánh mạnh. Các chồi sinh trưởng rất tốt, lá to và xanh đậm. Đối với môi trường chọn lọc bổ sung Km từ 25 - 150 mg/l đã có ảnh hưởng khá rõ rệt lên sinh trưởng phát triển và tạo rễ của chồi. Ở môi trường bổ sung Km 25 mg/l, có 75% mẫu tạo rễ, các chồi vẫn sinh trưởng khá tốt, lá nhỏ và xanh nhạt. Môi trường tương đương bổ sung Km 50 mg/l, có 25% chồi tạo rễ, các chồi sinh trưởng chậm, lá nhỏ và vàng nhạt. Còn đối với môi trường tương đương có Km 75 mg/l, tỉ lệ chồi tạo rễ chỉ đạt 8,5%, các chồi sinh trưởng rất kém, lá nhỏ và vàng. Môi trường chọn lọc bổ sung Km 100 mg/l, các chồi vẫn sống sót nhưng còi cọc, sinh trưởng chậm, lá vàng, hầu như không tạo rễ, tỉ lệ tạo rễ chỉ đạt 2,5%. Môi trường chọn lọc bổ sung Km đến 150 mg/l đã ức chế hoàn toàn khả năng tạo rễ của chồi. Một số kết quả nghiên cứu đã sử dụng nồng độ kanamycin khác nhau để sàng lọc các cây chuyển gen, có thể là 100 mg/l (Luo et al., 2006) hoặc kanamycin 50 mg/l được sử dụng cả trên môi trường tái sinh và môi trường nhân giống rất hiệu quả đối với hai giống Jewel và CEMSA 78354 (Xing et al., 2008).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của kanamycin đến khả năng ra rễ và sống sót của chồi**

Kanamycin (mg/l)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Đặc điểm rễ	Đặc điểm của chồi sau 30 ngày
0	100 ± 0,0	Dài, mập	Mập, lá to, xanh thẫm
25	75,0 ± 10,2	Dài, mập	Nhỏ, lá trung bình, xanh nhạt
50	25,0 ± 5,12	Ngắn, mảnh	Nhỏ, lá trung bình, vàng nhạt
75	8,5 ± 3,5	Ngắn, mảnh	Nhỏ, lá nhỏ, vàng nhạt
100	2,5 ± 5,77		Không tạo rễ, vàng
150	0		Không tạo rễ, vàng
200	0		Không tạo rễ, vàng, chết

Dấu (-): Không có chồi hoặc rễ

**Kết quả bước đầu về chuyển gen vào giống khoai lang KB1**

**Bảng 5. Kết quả ban đầu về chuyển gen vào giống khoai lang KB1**

Lô thí nghiệm	Số mẫu (cái)	Số mẫu tạo mô sẹo (cái)	Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)	Số mô sẹo sống sót (cái)	Tỉ lệ mô sẹo sống sót (%)	Số cây tái sinh (cây)	Số cây ra rễ C+Km
1	314	150	47,77	70	22,29	9	3
2	289	120	41,52	75	25,25	11	4
3	229	155	65,50	65	28,38	1	1
Tổng	832	425	51,60	210	25,31	21	8

Từ các kết quả nghiên cứu tối ưu quy trình chuyển gen vào khoai lang ở trên, chúng tôi tiến hành chuyển gen vào đỉnh chồi và mảnh lá của giống khoai lang KB1 theo quy trình chuyển gen đã xây dựng để đánh giá hiệu quả của quy trình chuyển gen (Bảng 5). Kết quả thu được cho thấy ở 3 lô thí nghiệm chúng tôi thu được tổng số 210 mô sẹo sống sót trên môi trường chọn lọc. Chúng tôi lấy ngẫu nhiên các mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc và trước khi chuyển sang môi trường tái sinh để kiểm tra sự biểu hiện của gen Gus ở mức độ mô sẹo. Kết quả nhuộm Gus cho thấy hầu hết các mô sẹo sống sót đều có màu xanh đậm rất đậm, chứng tỏ gen Gus đã được chuyển vào tế bào mô sẹo và nhân lên trên môi trường nuôi cấy mô sẹo. Khi chuyển các mô sẹo sống sót sang môi trường tái sinh đã thu được 21 cây tái sinh. Kết quả chọn lọc thu được 8 dòng cây chuyển gen ra rễ trên môi trường có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Đây là những kết quả bước đầu khẳng định sự thành công của quy trình chuyển gen xây dựng được, làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyển gen kháng bệnh vào khoai lang ở Việt Nam.



Hình 3. Khoai lang chuyển gen biểu hiện gus ở các giai đoạn khác nhau A,B: Ngon, là biểu hiện gus tạm thời sau 2 ngày; C,D: mô sẹo biểu hiện gus sau 15 ngày và 40 ngày; E: Mô sẹo chuyển gen, F: Chồi chuyển gen tái sinh từ mô sẹo

**KẾT LUẬN**

Đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình chuyển gen gus vào khoai lang thông qua *A.tumefaciens* bao gồm: Vật liệu biến nạp là đỉnh ngon, nồng độ OD<sub>600</sub> = 0,8, nồng độ Acetosyringone 150 µM, thời gian nhiễm khuẩn 20-30 phút. Nồng độ chọn lọc kanamycin trên môi trường chọn lọc mô sẹo và chọn lọc chồi chuyển gen phù hợp là 50 mg/l và 100 mg/l. Kết quả bước đầu chuyển gen gus vào giống khoai lang KB1 là các dòng mô sẹo sống sót đều biểu hiện hoạt động gen gus và thu được 8/21 dòng cây khoai lang chuyển gen gus ra rễ trên môi trường chọn lọc.

**Lời cảm ơn**

Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài "Nghiên cứu tạo giống khoai lang kháng bệnh bằng công nghệ gen" và được thực hiện với sự hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Gonzalez RG, Sanchez DS, Guerra ZZ, Campos JM, Quesada AL, Valdivia RM, Arenobia AD, Bravo KQ, Calgari Peter DS (2008) Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 16 (2) : 25 - 33.

Jefferson RA (1987). Assaying chimera gene in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep* 5: 387 - 405.

Luo HR, Santa M, Benavides J, Zhang DP, Zhang YZ and Ghislain M (2006) Rapid genetic transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) via organogenesis. *African Journal of Biotechnology* 5 (20): 1851 - 1857.

Otani M, Shimada T, Kimura T and Saito A (1998) Transgenic plant production from embryogenic callus of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* 15: 11-16.

Xing JY, Ji Q, Yang Q, Luo Y, Li Q, Wang X (2008) Studies on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato. *African Journal of Biotechnology* 7(5): 534 - 540.

Xing Y., Qing Yang Q., Ji Q., Luo Y., Zhang Y., Ke Gu K. And Wang D (2007) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for sweet potato embryogenic callus using β-glucuronidase (GUS) as a reporter. *African Journal of Biotechnology* 6(22): 2576 - 2584.

Yang J, Bi HP, Fan WJ, Zhang M, Wang H, Zhang P (2011) Efficient *Agrobacterium* suspension culturing and rapid transformation of a range of elite genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam. *Plant Science* 181: 701 - 71

Yu B, Zhai H, Wang Y, Zang N, Wang Y, Liu Q (2007) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas*(L.) Lam. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90: 265 - 273.

**RESEARCH ON FACTORS AFFECTING AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF SWEET POTATO**

Vu Thi Lan<sup>1,2</sup>, Mai Thi Phuong Nga<sup>1,2</sup>, Nguyen Trung Nam<sup>2</sup>, Le Thu Ngoc<sup>1</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>, Le Tran Binh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology; <sup>2</sup> College of Science, Thai Nguyen University, <sup>3</sup>University of Science and Technology of Ha Noi

**SUMMARY**

In this research, *Agrobacterium*-mediated transformation factors for sweet potato embryogenic calli were optimized using glucuronidase (GUS) as a reporter gene. Transformation parameters were optimized including bacterial concentration, acetosyringone (AS) concentration, explant materials, infection time, kanamycin concentration. Results suggested that the apical infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 at concentration OD<sub>600nm</sub> 0.8, 150 µM acetosyringone in 20-30 min gave the highest percentage of GUS positive transformants (38%). Transgenic calli were selected in CP3 medium (added 500 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamycin) in 3-4 weeks, then shoot regenerated from survival calli; were transferred in MS medium with 100 mg/l kanamycin. The results of gus transformation in KB1 variety showed that almost survival calli gave GUS positive transformants and gained 8/21 transgenic plant lines in selection medium (kanamycin 50 mg/l). These results will help us to research deeply to create transgenic sweet potato that can resist to sweet potato weevil larvae.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Ipomoea batatas* L., gus gene, KB1 variety, transformation  
 \*Author for correspondence: Tel: 091 450 4250; Email: lanvtdhkt@gmail.com