

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN VÀO CÂY HOA ĐỒNG TIỀN *Gerbera jamesonii* "FERRARI" NHỜ VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Initial results of gene transfer into *Gerbera jamesonii* "Ferrari" via *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyễn Quang Thạch¹, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Thanh Phương,
Đình Trường Sơn, Vũ Ngọc Lan, Trần Ngọc Tuấn
Trần Thị Cúc Hòa², Phạm Ngọc Thạch

SUMMARY

This study have verified some parameters and established the protocol for gene transferring in Gerbera (Ferrari variety). The concentration of cefotaxime to kill the bacteria in the medium was 500 mg l⁻¹. The concentration of PPT using for Gerbera callus selection was 2.5 mg l⁻¹ and the PPT concentration using for selecting the transgenic plants was 3mg l⁻¹. The co cultivation medium for bacteria and callus was mixed following Murashige and Skoog (1962), one little with amount of 30g sucrose, 10g glucose, 2mg BA, 0.3 mg kinetin, 0.1mg IAA, 1g cassamino acid, 20mg AS and 7.0 g agar. The pH of the solution was adjusted to 5.4. The protocol for gene transformation was established and two clones of gerbera were multiplied after selecting on the medium supplemented with PPR at 3.0 mg l⁻¹. The electrophoresis results of PCR products with detected nos terminator primer pairs showed the gene was cloned using DNA template extracted from leaf tissue of the gerbera clones. This result confirmed the present of the target genes in the two regenerated clones selected after transformation.

Key words: *Gerbera Agrobacterium, transgenic plants.*

1. MỞ ĐẦU

Nghiên cứu tạo giống bằng các phương pháp chuyển gen hiện đã thu được rất nhiều thành công ở các phòng thí nghiệm trên thế giới. Một số nghiên cứu về chuyển gen đã được triển khai nghiên cứu ở nước ta. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào một số đối tượng cây thực phẩm hoặc cây công nghiệp như: lúa, ngô, cà chua, bắp cải, đu đủ, bông vải... (Đặng Trọng Lương, 2001), (Lê Trần Bình, 2005). Các nghiên cứu về chuyển gen trên đối tượng hoa cây cảnh

cúc của Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh.

Hoa đồng tiền là một trong những loài hoa phổ biến trên thế giới, được sử dụng làm hoa chậu, hoa cắt cành, hoa trồng cảnh (Teresa, Elzbieta, Danuta, 1999). Ở nước ta, hoa đồng tiền được trồng khá phổ biến, có giá trị kinh tế cao và đặc biệt là hoa đồng tiền có thể ra hoa vào thời vụ mùa hè ngoài miền Bắc là thời gian hiếm hoa trong năm (Nguyễn Quang Thạch, 2002). Chính vì vậy, việc

¹ Viện Sinh học Nông nghiệp - Đại học Nông nghiệp I Hà Nội

² Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long – Ômôn - Cần Thơ

còn ít được quan tâm. Mới chỉ có 1 công trình công bố về chuyển gen cho cây hoa

nghiên cứu tạo giống hoa đồng tiền bằng kỹ thuật chuyển gen sẽ góp phần tạo

được nguồn vật liệu ban đầu phục vụ công tác chọn tạo giống đồng tiền có các đặc tính mong muốn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- *Gerbera jamesonii* “Ferrari”.
- Sử dụng vi khuẩn chủng EHA105 mang vector ITB2c mang các gen *gus*, *bar*, *cryIAc* do Viện sinh học Nhiệt đới TPHCM - VKHVN cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng các biện pháp nghiên cứu nuôi cấy mô hiện hành.
- Sử dụng phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- Môi trường tái sinh chồi đồng tiền: MS, 30g/l sucrose, 10g/l gluco, 2mg/l BA, 0.3mg/l kinetin, 0,1mg/l IAA, 2g/l phytagel, pH = 5,4.
- Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn.
- Chuẩn bị dịch vi khuẩn trước khi lây nhiễm: vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường lỏng LB (V. Nagaraju, 1998) (200 vòng/phút, 24 giờ). Dịch vi khuẩn được ly tâm để lấy sinh khối tế bào vi khuẩn ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng và được pha trong môi trường pha loãng.
- Phương pháp rửa vi khuẩn: Vi khuẩn được rửa nhanh từ 3-5 lần bằng nước cất vô trùng hoặc môi trường MS vô trùng

- Phương pháp nhiễm mẫu với vi khuẩn: Mẫu cây callus được ngâm trong dung dịch vi khuẩn với thời gian 5 phút, vớt ra, để khô trên giấy thấm vô trùng sau đó được cấy lên môi trường đồng nuôi cấy.

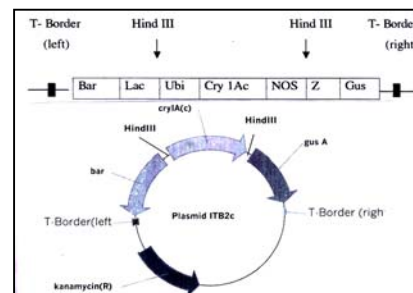
- Điều kiện đồng nuôi cấy: nhiệt độ 24⁰C, che tối, nuôi cấy trong 48 - 72 giờ.

- Phương pháp xác định sự biểu hiện ban đầu của gen *gus* theo Jefferson (1987).

- Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).



Hình 1. Đồng tiền Ferrari



Hình 2. Sơ đồ cấu trúc plasmid ITB2c

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhóm thí nghiệm tiền chuyển gen

Trong quy trình chuyển gen nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens*, việc bổ sung kháng sinh khi tiến hành diệt vi khuẩn *A.tumefaciens* có thể ảnh hưởng đến khả năng tái sinh [Purnima, Kothari, 2004], [Nagaraju, Sita, 1998], [Hoshi & cs, 2004]. Bên cạnh đó, cũng cần xác định được ngưỡng có tác dụng gây chết 100% của chất chọn lọc để làm cơ sở cho chọn lọc. Chính vì thế, chúng tôi tiến hành xác định ảnh

hưởng của các yếu tố trên đến khả năng tái sinh của vảy củ lily Siberia. Sự ảnh hưởng của kháng sinh cefotaxime đến tỷ lệ sống và khả năng tái sinh của mô cây đồng tiền được thể hiện khi bổ sung kháng sinh cefotaxime từ nồng độ 300 đến 700ppm vẫn cho tỷ lệ sống của callus đạt 100% trên tất cả các công thức. Điều đó cho thấy callus có khả năng sống rất mạnh mặc dù đã bị ức chế bởi kháng sinh cefotaxime. Kháng sinh cefotaxime đã ức chế sự sinh trưởng của các chồi tái sinh và rõ ràng là đã ảnh hưởng tới chất lượng của chồi tái sinh. Điều này được thể hiện

rõ qua các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển như: chiều cao chồi tái sinh đã giảm từ 2,8cm (công thức không bổ sung) xuống còn 2,3cm (công thức bổ sung 600ppm); số lá giảm từ 3,5 (công thức không bổ sung) xuống 1,6 lá/chồi (công thức bổ sung 600ppm), bên cạnh đó, chồi tái sinh nhỏ, thấp, màu xanh nhạt hơi vàng (bảng 1). Như vậy, đối với nguồn mẫu cây là callus đồng tiền giống Ferrari, có thể sử dụng kháng sinh cefotaxime ở nồng độ đến 500mg/lít để diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Bảng 1. Ảnh hưởng của kháng sinh cefotaxime đến tỷ lệ sống và khả năng tái sinh của callus cây đồng tiền (theo dõi sau 6 tuần)

CT	cefotaxime	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Tăng trưởng của chồi tái sinh			Hình thái mẫu cây và chồi tái sinh
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá/chồi (lá)		
CT1	0	100	100	0	100	2,8	3,5	+++	
CT2	300	100	100	0	90,2	2,8	2,8	+++	
CT3	400	100	100	0	75,3	2,5	2,2	++	
CT4	500	100	100	0	58,2	2,5	2,0	++	
CT5	600	100	100	0	28,9	2,3	1,6	+	
CT6	700	100	100	0	0				

Ghi chú: Môi trường nuôi cấy: MS, 30g sucrose/l, 10g gluco/l, 2mg BA/l, 0.3mg kinetin/lít, 0,1mgIAA/l, 7g thạch agar/l, pH = 5,4.
 +++: Mẫu cây xanh, chồi tái sinh sinh trưởng tốt, màu xanh, hình thái bình thường.
 ++: Mẫu cây là callus hơi vàng, chồi tái sinh sinh trưởng chậm, lá có màu xanh hơi nhạt, chồi nhỏ.
 +: Mẫu cây là callus màu vàng, chồi tái sinh sinh trưởng kém, chồi nhỏ, thấp, màu xanh vàng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của PPT đến khả năng tái sinh của callus đồng tiền giống Ferrari (theo dõi sau 5 tuần)

CT	PPT (ppm)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Tăng trưởng của chồi tái sinh			Hình thái mẫu cây và chồi tái sinh
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá/chồi (lá)		
CT1	0	100	100	0	100	2,5	3,2	+++	
CT2	0,5	100	100	0	80	2,5	2,5	++	
CT3	1,0	100	100	0	100	2,0	2,0	++	
CT4	1,5	80	80	0	60	1,3	1,3	++	
CT5	2,0	30	30	0	10	0,8	1,2	+	
CT6	2,5	0	0	0	0	0	0		
CT7	3,0	0	0	0	0	0	0		

Ghi chú: Môi trường nuôi cấy: MS, 30g sucrose/l, 10g gluco/l, 2mg BA/l, 0,3mg kinetin/lít, 0,1mgIAA/l, 7g thạch agar/l, pH = 5,4.
 +++: Mẫu cây xanh, chồi tái sinh sinh trưởng tốt, màu xanh, hình thái bình thường
 ++: Mẫu cây là callus có màu đen, chồi tái sinh sinh trưởng chậm, lá vàng, có biểu hiện mất màu diệp lục, chồi nhỏ.
 +: Mẫu cây đen, ban đầu có tái sinh tạo chồi, sau tái sinh 3 - 4 tuần các lá của chồi tái sinh xuất hiện các điểm chết.

Chất chọn lọc PPT đã có ảnh hưởng rất xấu tới tỷ lệ sống của callus. Nồng độ PPT càng cao càng ức chế sự tái sinh đồng thời gây chết mẫu cây. Bổ sung PPT ở nồng độ 2,5mg/lít đã gây chết 100% mẫu cây là callus. PPT đã gây độc rất mạnh đối với các chồi tái sinh. Mẫu cây hoàn toàn không có khả năng tái sinh tạo rễ, các chồi tái sinh ban đầu có màu vàng sau đó mất màu diệp lục, tiếp đến là xuất hiện các điểm chết trên đầu mút lá (bảng 2). Do vậy, có thể sử dụng nồng độ PPT ở mức 2,5mg/lít cho callus đã được chuyển gen kháng PPT.



Hình 3. Chồi đồng tiền trên môi trường chọn lọc bằng PPT

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đến khả năng sống của cây đồng tiền in vitro (kết quả theo dõi sau 8 tuần)

CT	PPT (ppm)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Tăng trưởng của chồi tái sinh			Hình thái mẫu cây và chồi tái sinh
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá/chồi (lá)		
CT1	0	100	0	100	100	2,8	3,5	+++	
CT2	0,5	100	0	0	100	2,1	2,9	++	
CT3	1,0	100	0	0	100	1,3	2,0	+	
CT4	1,5	40	0	0	40	1,0	2,0	+	
CT5	2,0	30	0	0	30	1,0	2,0	+	
CT6	2,5	10	0	0	10	1,0	2,0	+	
CT7	3,0	0	0	0	0	0	0		

Ghi chú: Tiêu chuẩn chồi thí nghiệm: sinh trưởng bình thường, cao 1cm, có 2 lá.
 Môi trường nuôi cấy: môi trường MS
 +++: Chồi xanh, sinh trưởng tốt, hình thái bình thường
 ++: Chồi sinh trưởng chậm, nhỏ, lá vàng, có biểu hiện mất màu diệp lục.
 +: Chồi sinh trưởng chậm, ban đầu bị vàng lá sau đó xuất hiện các điểm chết tại đầu mút lá.

PPT đã có ảnh hưởng rất sâu tới tỷ lệ sống của cây đồng tiền. Bổ sung PPT từ nồng độ 0 - 3,0mg/lít đã làm giảm tỷ lệ sống của cây đồng tiền từ 100% xuống 0% (công thức bổ sung 3ppm PPT). Đồng thời, PPT có tác dụng ức chế rất

mạnh khả năng sinh trưởng của cây đồng tiền. Ngay ở công thức 3 (công thức bổ sung 1,0 mg PPT/lít) mặc dù tỷ lệ sống vẫn đạt 100% nhưng gần như sự sinh trưởng của cây đồng tiền đã bị ngừng hẳn, chiều cao chỉ tăng 0,3cm, số lá không tăng sau 4 tuần nuôi cấy. Mẫu cây hoàn toàn không có khả năng sinh trưởng trên các công thức bổ sung PPT ở nồng độ từ 1,5 - 2,5mg/lít. Ở nồng độ

này đã làm ngừng hẳn sự sinh trưởng về chiều cao, số lá, phần góc chìm trong môi trường bị đen, nhiều lá bị vàng. Nồng độ PPT ở mức 3,0ppm là nồng độ gây chết 100% đối với cây đồng tiền *in vitro*. Vì vậy có thể sử dụng nồng độ PPT ở mức 3,0ppm trở lên làm nồng độ dùng cho chọn lọc các cây đồng tiền đã được chuyển gen kháng PPT trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

3.2. Các thí nghiệm chuyển gen

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy mẫu, phương pháp lây nhiễm đến sự sinh trưởng của vi khuẩn *Agrobacterium* trên một số giống đồng tiền (theo dõi sau đồng nuôi cấy 2 ngày)

STT	Phương pháp lây nhiễm		Tỷ lệ sống của mẫu cấy (%)	Xuất hiện vi khuẩn	
	Nhỏ giọt	Ngâm		Không	Có
	+		100		+
		+	100		+

Khả năng chuyển gen nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens* phụ thuộc khá nhiều vào đối tượng cây trồng, nguồn mẫu lây nhiễm. Một số cây trong quá trình sinh trưởng đã sản sinh ra phytoxic là chất có khả năng ức chế sinh trưởng rất mạnh đối với vi khuẩn [Hoshi & cs, 2004]. Khi được đồng nuôi cấy với callus đồng tiền Ferrari, sự sinh trưởng của vi khuẩn *A.tumefaciens* là khá mạnh và không phụ thuộc vào phương pháp lây nhiễm (bảng 4). Rõ ràng, trên đối tượng đồng tiền, vi khuẩn *Agrobacterium* dễ dàng sinh trưởng và phát triển mạnh. Đây là một thuận lợi cho

quá trình lây nhiễm nhưng lại là khó khăn ở giai đoạn kế tiếp. Thông thường, nếu vi khuẩn sinh trưởng và phát triển mạnh trong quá trình đồng nuôi cấy, quá trình phục hồi cũng như chọn lọc sau này sẽ rất khó khăn để loại bỏ được chính vi khuẩn này.

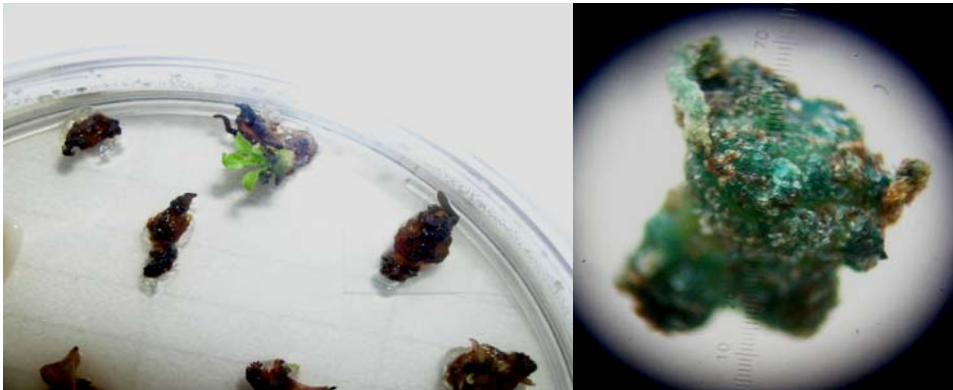
3.3. Biểu hiện của gen *gus* và biểu hiện gen kháng PPT

Các kết quả chọn lọc và tái sinh cây đồng tiền sau chuyển gen được thể hiện ở bảng 5.

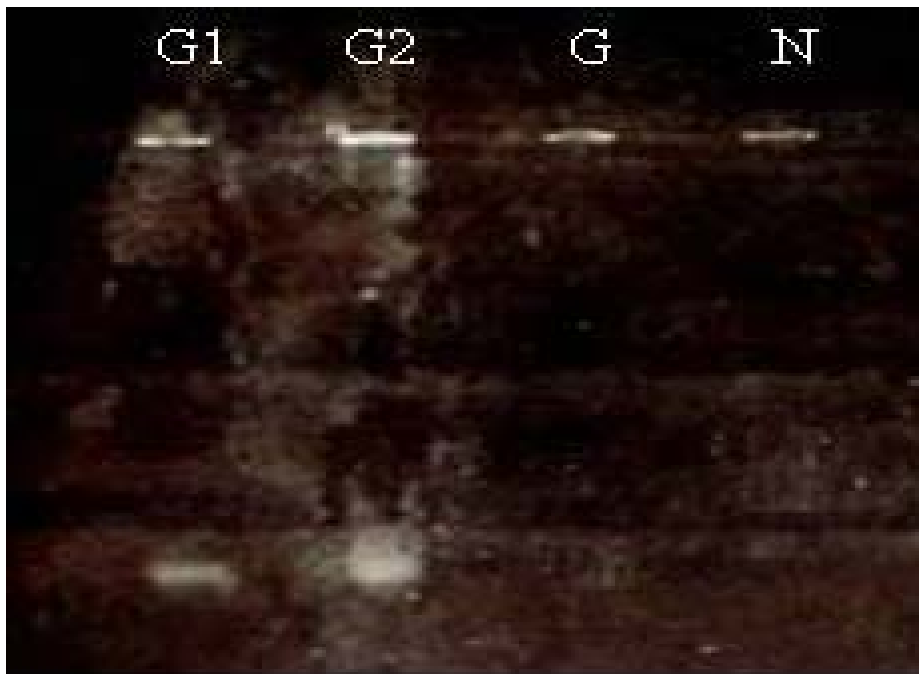
Bảng 5. Kết quả chọn lọc trên đối tượng hoa đồng tiền giống Ferrari

Công thức	Số mẫu chọn (mẫu)	Số mẫu cây lọc chết (mẫu)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Số cây tái sinh sau chọn lọc (cây)	Tỷ lệ tái sinh cây sau chọn lọc (%)	Hình thái cây tái sinh
Đối chứng (không đồng nuôi cấy với vi khuẩn)	30	30	100	0	0	
Chuyển gen (đồng nuôi cấy với vi khuẩn)	770	668	99,84	2	0,26	Bình thường

Ghi chú: chọn lọc trên môi trường có bổ sung 3mg PPT/lít.



Hình 4. Sự tái sinh trên môi trường chọn lọc và sự biểu hiện của gen gus trên callus đồng tiền



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng đoạn mồi phát hiện nos terminator

Ghi chú: G1: dòng đồng tiền chuyển gen 1, G2: dòng đồng tiền chuyển gen 2, G: cây đồng tiền Ferrari chưa chuyển gen, Nước: nước cất 2 lần vô trùng,

Kết quả bảng 5 cho thấy: 100% mẫu cây trên công thức đối chứng đều chết sau chọn lọc. Điều đó chứng tỏ tác động gây chết của PPT đối với cây đồng tiền. Trên công thức có đồng nuôi cấy với vi khuẩn

Agrobacterium, đã thu được hai cây đồng tiền tái sinh sinh trưởng tốt và có hình thái bình thường. Rõ ràng, đã có sự thay đổi về khả năng kháng PPT, cụ thể là tăng khả năng kháng PPT của cây đồng tiền tái sinh. Kết quả trên cho phép tạm thời kết luận hai

cây đồng tiền đó đã được chuyển gen *bar* là gen kháng PPT.

Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi phát hiện *nos terminator* cho thấy đã nhận được đoạn gen này từ ADN khuôn tách chiết từ mô lá của hai cây đồng tiền Ferrari chuyển gen. Kết quả này cho phép khẳng định sự hiện diện của gen chuyển vào ở 2 dòng đồng tiền chọn lọc được sau chuyển gen.

4. KẾT LUẬN

Một số các thông số trong quy trình chuyển gen cho cây đồng tiền Ferrari nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được xác định. Chất kháng sinh cefotaxime bổ sung vào môi trường nuôi cấy để diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được xác định ở nồng độ 500mg/lít. Nồng độ PPT dùng cho chọn lọc là 2,5mg/lít cho callus và 3,0ppm trở lên được dùng làm nồng độ cho chọn lọc các cây đồng tiền đó được chuyển gen kháng PPT trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Môi trường đồng nuôi cấy vi khuẩn và callus đồng tiền là: MS, 30g/l sucrose, 10g/l gluco, 2mg/l BA, 0,3mg/l kinetin, 0,1mg/l IAA, 1g/l cassamino acid, 20mg/l AS, 7,0 gram agar/lít pH = 5,4. Sau chọn lọc 3 lần, đã có sự biểu hiện của gen *gus* trong callus đồng tiền Ferrari. Trên môi trường có bổ sung PPT ở nồng độ 3,0 mg/lít, đã tái sinh được 2 cây đồng tiền sau chọn lọc. Kết quả điện di sau khi nhận đoạn gen *nos* cho phép khẳng định đã thu được hai cây đồng tiền chuyển gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Trọng Lương (2001). “Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* nhằm góp phần tạo vật liệu chọn giống bắp cải kháng sâu ở Việt Nam”. Luận án tiến sĩ nông nghiệp. Trang 9- 13.
- Lê Trần Bình (2005). “Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi. Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài trang 9-15.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Hoa (2002). Nghiên cứu quy trình nhân nhanh cây hoa đồng tiền. Báo cáo tổng kết đề tài, 2002.
- Purnima Tyagi and S L Kothari, (2004). Rapid *in vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* from different explants Indian. Journal of Biotechnology Vol 3, October 2004, pp 584-588.
- Teresa Orlikowska, Elzbieta Nowak, Agnieszka Marasek, Danuta Kucharska (1999). Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles, Plant Cell Tissue and Organ Culture.
- V. Nagaraju, G.S.L.Srinivas và G.Lakshmi Sita (1998). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*. Current science, Vol.74, No.7,10 April 1998.
- Y.Hoshi, M.Kondo, S.Mori, Y.Adachi, M.Nakano, H.Kobayashi, (2004). Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation, Plant Cell Rep (2004) 22: trang 359-364.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài trọng điểm cấp Bộ của Giáo Dục và Đào tạo, mã số B2004-32-100.TĐ. Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Văn Uyên, Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh đã nhiệt tình giúp đỡ trong việc cung cấp nguồn vật liệu phục vụ chuyên gen.