

NGHIÊN CỨU TÁI SINH *IN VITRO* VÀ CHUYỂN GEN GREEN FLUORESCENT PROTEIN VÀO CÂY HOA LOA KÈN (*LILIUM LONGIFLORUM*) NHỜ VI KHUẨN *AGROBACTERIUM*

Study on *In vitro* Regeneration and GFP Gene Transfer in *Lilium longiflorum* via *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyễn Thị Lý Anh, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thị Thanh Phương, Nguyễn Thị Hoa

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Kỹ thuật chuyển gen được sử dụng để chọn tạo các giống cây trồng mang đặc tính mong muốn. Thông qua nghiên cứu nuôi cấy mô vảy củ *in vitro* và chuyển gen *GFP* (green fluorescent protein) vào callus hoa loa kèn trắng (*Lilium longiflorum*) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, đã xác định được môi trường tái sinh thích hợp cho mô nuôi cấy và làm rõ ảnh hưởng của một số khâu kỹ thuật đến quá trình chuyển gen. Kháng định được môi trường tốt nhất để tạo callus là MS +8% saccharose + 0,5mg/l BA + 0,5mg/l 2,4D và để tái sinh chồi từ callus nên sử dụng môi trường MS + 2% saccharose + 0,25mg/l BA. Quá trình chuyển gen *GFP* đạt hiệu quả cao khi callus được nuôi cấy khời động 5 ngày trước khi lây nhiễm vi khuẩn và để lây nhiễm vi khuẩn callus được cắt trên giấy thấm, ngâm trong dung dịch vi khuẩn trong 5 phút, sau đó đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Gen *GFP* được biểu hiện với tỷ lệ cao ở callus (52,38 – 62,35%) và rễ của cây tái sinh (31,25 – 52,94%) trong khi ở chồi tái sinh tỷ lệ này chỉ đạt 1,25%. Các kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong tạo giống hoa loa kèn chuyển gen.

Từ khóa: Chuyển gen, *GFP*, *Lilium longiflorum*, tái sinh.

SUMMARY

The *in vitro* regeneration and *GFP* gene transfer to *Lilium longiflorum* via *Agrobacterium tumefaciens* were studied with the aim to determine optimal regeneration medium and influences of technical stages on gene transformation. The combination of 2.4D and 6-benzyladenine (BA) in Murashige and Skoog (1962) basic medium proved effective in inducing callus formation. The MS medium containing BA at 0.5 mg/liter and 2.4D at 0.5 mg/liter was found suitable for callus induction, while the MS basic medium supplemented with 0.25 mg BA/liter, 20 gram sucrose, with pH adjusted to 5.8 before autoclave appeared optimal for shoot induction from callus. To successfully transform *GFP* gene the callus should be pre-cultured on regeneration medium before co-culture with *A. tumefaciens*. The callus should then be cut on filter paper, dipped in *A. tumefaciens* solution for 5 minutes and co-cultivated with *A. tumefaciens* for 3 days on regeneration medium. *GFP* gene expression was clear with high expression rate (52.38 to 62.35% in calli, 31.25 to 52.94% in roots and 1.25% in shoots).

Key words: *GFP* gene transfer, *Lilium longiflorum*, regeneration.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa loa kèn (*Lilium longiflorum*) là một trong những loài hoa đẹp, bền, rất được ưa thích và đã được trồng phổ biến ở nước ta từ rất lâu đời. Do đó, việc nghiên cứu nhằm cải tiến các đặc tính nông sinh học của cây hoa loa kèn trắng *Lilium longiflorum* là rất cần thiết.

Hiện nay, việc cải tiến và tạo giống cây trồng mới bằng kỹ thuật chuyển gen đã trở nên phổ biến trên thế giới (Clive, 2008) và đã có nhiều nghiên cứu chuyển gen nhằm tạo được cây hoa loa kèn mang các gen mong muốn. Watad và cs. (1998) đã tiến hành nghiên cứu chuyển gen thành công cho *Lilium longiflorum* bằng cách sử dụng

phương pháp bắn gen vào callus tái sinh từ vảy củ. Mercuri và cs. (2003), Hoshi (2004, 2005) đã sử dụng thành công phương pháp biến nạp gen cho cây hoa loa kèn bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Ở Việt Nam, nhiều kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* trên đối tượng hoa loa kèn đã được công bố (Mai Xuân Lương, 1993; Nguyễn Quang Thạch 1996, 1999; Dương Tấn Nhựt, 2004). Nguyễn Thị Lý Anh (2007), Nguyễn Quang Thạch (2006) và Nguyễn Thị Phương Thảo (2008) cũng đã nghiên cứu sự tái sinh *in vitro* và thử nghiệm chuyển gen cho các giống hoa lily *Lilium* Oriental hybrid “Siberia”, *Lilium* × *formolongo*. Tuy nhiên, đến nay việc nghiên cứu sự tái sinh và chuyển gen cho cây hoa loa kèn chưa được đề cập ở nước ta.

Mục đích của công trình này là xác định được môi trường tái sinh thích hợp đồng thời làm rõ ảnh hưởng của một số bước kỹ thuật đến quá trình chuyển gen *GFP* (green fluorescent protein) vào cây hoa loa kèn trắng *Lilium longiflorum* làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong tạo giống hoa loa kèn chuyển gen.



Hình 1. *Lilium longiflorum*



Hình 2. Sơ đồ plasmid mang gen phát huỳnh quang *GFP*

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Sử dụng vảy củ *in vitro* của giống hoa loa kèn *Lilium longiflorum* được trồng phổ biến ở Bắc Việt Nam làm nguồn mẫu cấy ban đầu.

Các hoá chất sử dụng để tạo môi trường nuôi cấy, các chất kích thích sinh trưởng: 2,4D, BA

Vector chuyển gen: vi khuẩn *A.tumefaciens* dòng AA16 chứa plasmid pBINm-*GFP5-ER* mang gen mã hoá cho protein có khả năng phát huỳnh quang (green fluorescent protein - *GFP*) do Viện Di truyền cung cấp (Hình 2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy mô hiện hành và phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Các thí nghiệm được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức được bố trí 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 50 - 200 mẫu tùy từng thí nghiệm.

Môi trường nuôi cấy mô là môi trường MS (1962), pH 5,8 trước khi khử trùng và có bổ sung đường saccarose, các chất điều tiết sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau tùy từng thí nghiệm. Đối với nghiên cứu xác định môi trường tái sinh tạo callus từ mô vảy củ, tổ hợp các chất kích thích sinh trưởng BA và 2,4D được bổ sung vào các công thức khác với các nồng độ từ 0,5 đến 1,5 mg/l (trừ công thức đối chứng). Callus tạo được từ công thức tối ưu của thí nghiệm trên đã được cấy chuyển vào môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0mg/l để xác định môi trường tái sinh cây từ callus.

Sau khi có được nguồn mẫu thích hợp, tiến hành chuẩn bị dịch vi khuẩn trước khi lây nhiễm: vi khuẩn được nuôi trên môi

trường LB lỏng: Tripton 10 g/l + NaCl 10 mg/l + cao nấm men 5g/l (200 vòng/phút, 240C, 24 giờ). Dịch vi khuẩn được ly tâm lấy sinh khối ở tốc độ 5000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng và được pha trong môi trường đồng nuôi cấy loãng.

Môi trường đồng nuôi cấy (môi trường nuôi cấy mẫu sau lây nhiễm với vi khuẩn): MS (không có NH_4NO_3) + 20 mg AS/l + 20 g sucrose/l + 10 g gluco/l + 10 mM MES + 0,25 mgBA/l + 1g cassamino acid/l + 700 mg L-asparagine monohydrat/l + 700 mg L-glutamine/l + 7 g agar/l. Điều kiện đồng nuôi cấy: 24°C, tối.

Mẫu được ngâm trong dung dịch vi khuẩn trong 5 phút, thời gian đồng nuôi cấy là 3 ngày. Mẫu sau khi đồng nuôi cấy với vi khuẩn được rửa khuẩn nhanh 3 - 5 lần trong nước cất vô trùng hoặc trong môi trường MS vô trùng, sau đó chuyển mẫu sang nuôi cấy trên môi trường diệt khuẩn. Môi trường diệt khuẩn gồm môi trường tái sinh chồi tốt nhất từ callus có bổ sung 500 mg/l cefotaxime. Mẫu cấy tái sinh được nuôi trong điều kiện 16 giờ sáng/8 giờ tối, cường độ chiếu sáng 2500 lux, nhiệt độ nuôi cấy $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Tỷ lệ tạo chồi, tạo rễ được tính theo số mẫu sống sau khi tái sinh.

Sự biểu hiện của gen GFP trên callus, chồi và rễ được kiểm tra tại Viện Di truyền Nông nghiệp. Mỗi công thức kiểm tra 20 mẫu.

Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình IRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu môi trường tái sinh

Các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây hoa loa kèn đều khẳng định mô vảy củ là loại mô có khả năng tái sinh cao (Nguyễn Quang Thạch, 1996, 1999; Dương Tấn Nhựt, 2004). Để có nguồn mẫu thích hợp cho thí nghiệm chuyển gen, chúng tôi đã tiến hành

xác định môi trường tạo callus từ mô vảy củ và môi trường tái sinh cây từ callus.

3.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA và 2,4D đến sự hình thành callus của mô vảy củ

Để tế bào vảy củ có thể phản phân hoá và hình thành callus, môi trường nuôi cấy đã được bổ sung tổ hợp BA và 2,4D với các nồng độ khác nhau. Số liệu thực nghiệm trong bảng 1 cho thấy, CT1 (Đ/C) cho tỷ lệ sống, tỷ lệ tạo callus là cao nhất đồng thời đây là công thức duy nhất có mẫu cấy tái sinh tạo chồi với tỷ lệ khá cao, đạt 46,67%. Điều này khẳng định kết luận của các tác giả nêu trên về khả năng phát sinh hình thái của mô vảy củ. Tuy nhiên, callus tái sinh ở công thức này lại không có khả năng tạo chồi.

Bổ sung nồng độ cao của BA và 2,4D đã làm giảm tỷ lệ sống của vảy củ *Lilium longiflorum* một cách rõ rệt. Tỷ lệ sống đã giảm từ 100% ở CT1 (Đ/C) và CT2 xuống chỉ còn 41,38% ở CT7. Bên cạnh đó, tỷ lệ tạo callus giảm từ 90% ở CT1 xuống còn 14,29% ở CT7 (Bảng 1).

Quan sát hình thái của callus cho thấy, callus tái sinh từ CT2 là những callus phát triển tốt, màu vàng xanh, không xốp và có khả năng tái sinh tạo chồi trong khi callus tái sinh từ các công thức khác đều có chất lượng không tốt, khả năng tái sinh tạo chồi kém (Hình 3).

Như vậy, có thể sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg BA/lít + 0,5 mg 2,4D/lít để làm môi trường tái sinh tạo callus từ mô vảy củ làm nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm chuyển gen.



Hình 3. Ảnh hưởng của BA và 2,4D đến khả năng phát sinh hình thái của mô vảy củ

3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ callus

Callus tạo được từ công thức tối ưu của thí nghiệm trên đã được cấy chuyển vào môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả trình bày ở bảng 2 chỉ rõ, tỷ lệ sống và tạo callus trên tất cả các công thức đều đạt 100%. Như vậy, BA đã không gây ảnh hưởng tới tỷ lệ sống của callus. Tuy nhiên, bổ sung BA ở nồng độ từ 0,5 mg/lít trở lên không những gây ức chế khả năng tái sinh tạo chồi đồng thời số chồi tái sinh/mẫu

cây cũng giảm đi rõ rệt. Công thức bổ sung 1,0 mgBA/lít chỉ cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi còn 63,33% (CT5), trong khi đó công thức bổ sung 0,25 mgBA/lít (CT2) cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi cao nhất và đạt 94,4% (Bảng 2). Bên cạnh đó, chất lượng chồi cũng giảm đi khi tăng nồng độ BA trong môi trường tái sinh.

Như vậy, nồng độ của BA ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tạo chồi từ callus của hoa loa kèn. Môi trường thích hợp cho tái sinh chồi từ callus hoa loa kèn là MS + 2% đường sucrose + 0,25 mgBA/l.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và 2,4 D đến sự tái sinh callus của mô vảy củ (sau 8 tuần)

CT	BA (mg/l)	2,4D (mg/l)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ tạo callus (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Đặc điểm hình thái mẫu cấy
1	0,0	0,0	100,0	90,00	46,67	Callus phát triển bình thường, màu vàng hơi thâm, chồi mập, khoẻ
2	0,5	0,5	100,0	76,67	0,00	Callus phát triển tốt, màu vàng xanh, không xóp
3	0,5	1,0	93,33	51,72	0,00	Callus phát triển bình thường, màu vàng hơi thâm
4	1,0	0,5	73,33	30,43	0,00	Callus phát triển chậm, màu vàng hơi thâm
5	1,0	1,0	93,33	67,86	0,00	Callus phát triển khá, chặt, màu vàng
6	1,5	0,5	81,25	34,78	0,00	Callus phát triển kém
7	1,5	1,0	41,38	14,29	0,00	Callus phát triển rất kém, rất ít, màu vàng hơi đen

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 8% sucrose, pH: 5,8, CT: công thức

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 6 tuần)

CT	BA (mg/l)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ tạo callus (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số chồi/mẫu cấy (chồi)	Đặc điểm hình thái mẫu cấy
1	0,00	100	100	86,33	83,33	4,47 b	Rễ khoẻ, nhiều lông hút, dài, chồi khoẻ, mập
2	0,25	100	100	94,44	94,44	5,36 a	Rễ to, cứng, nhiều lông hút, dài, chồi rất mập, khoẻ,
3	0,50	100	100	80,56	77,78	3,72 c	Rễ dài, mảnh, nhiều lông hút, chồi khoẻ,
4	0,75	100	100	72,22	91,67	2,89 d	Rễ nhiều nhỏ, nhiều lông hút, hơi ngắn, chồi bé, ít,
5	1,00	100	100	63,33	86,67	1,86 e	Rễ nhiều lông hút, ngắn, chồi ít, bé,
CV%						4,70	
LSD _{0,05}						0,196	

Ghi chú: Nền môi trường MS + 2% sucrose, pH = 5,8

3.2. Nghiên cứu chuyển gen *GFP*

3.2.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy khởi động đến khả năng chuyển gen nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens*

Kết quả chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* phụ thuộc chặt chẽ vào trạng thái của tế bào mẫu cấy. Tế bào thực vật sinh trưởng tốt và bước vào quá trình phân chia thường có khả năng tiếp nhận gen chuyển cao. Điều này được thể hiện rõ trong thí nghiệm: callus

được cấy chuyển trên môi trường tái sinh (MS + 2% đường sucrose + 0,25 mg BA/1) trước khi lây nhiễm với vi khuẩn (mẫu cấy được nuôi cấy khởi động) từ 2 đến 5 ngày có ảnh hưởng tích cực tới khả năng sống và tái sinh của chúng. Ngoài ra, các cây tái sinh từ callus được tiên nuôi cấy có khả năng sinh trưởng tốt hơn hẳn so với cây tái sinh từ callus không qua giai đoạn nuôi cấy khởi động (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy khởi động đến khả năng tái sinh mẫu và chuyển gen (sau 8 tuần)

CT	Thời gian nuôi cấy khởi động (ngày)	Tỷ lệ mẫu sống sau tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Chiều cao TB cây (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Số chồi/mẫu cấy (cây)	Tỷ lệ biểu hiện gen GFP		
								Callus (%)	Chồi (%)	Rễ (%)
1 (Đ/C)	Không lây nhiễm	100	100	100	5,8	3,7	4,2	0,00	0,00	0,00
2	0	70,93	59,09	61,36	3,2	1,7	2,1	52,38	0,00	45,83
3	2	94,12	73,17	70,73	3,7	1,9	3,2	62,50	0,00	52,94
4	3	87,01	81,82	70,45	4,3	2,0	3,2	59,09	0,00	31,25
5	5	86,11	86,67	73,33	4,7	2,3	3,6	50,00	1,25	54,17
CV%					3,1	5,1	3,8			
LSD _{0,05}					0,158	0,139	0,144			

Hơn thế, các công thức có mẫu cấy được tiên nuôi cấy đều cho tỷ lệ và mức độ biểu hiện gen *GFP* cao hơn so với công thức không qua giai đoạn tiên nuôi cấy. Sự biểu hiện của gen *GFP* là tương đối rõ, tỷ lệ biểu hiện từ 52,38 - 62,5% đối với callus và 31,25 - 52,94% đối với rễ. Riêng công thức 5 là công thức duy nhất có sự biểu hiện của gen *GFP* trên chồi tái sinh. Tuy nhiên, tỷ lệ chồi có biểu hiện gen *GFP* chỉ đạt 1,25% và gen *GFP* chỉ được biểu hiện ở một vài vị trí trên một số lá của chồi (Bảng 3). Như vậy, để tăng khả năng chuyển gen mẫu cấy là callus nên được nuôi cấy khởi động 5 ngày trước khi lây nhiễm với vi khuẩn *A.tumefaciens* nhằm thích ứng mẫu trong môi trường nuôi cấy và kích thích sự phân chia của tế bào callus.

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp lây nhiễm đến khả năng chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens*

Phương pháp lây nhiễm vi khuẩn với mẫu cấy không chỉ bảo đảm đủ lượng vi khuẩn tiếp xúc và bám dính trên bề mặt bị thương của mô thực vật mà còn phải ít gây tác hại đến khả năng sống và tái sinh của mẫu. Kết quả trên bảng 4 cho thấy, tỷ lệ sống của callus đã lây nhiễm với vi khuẩn sau khi chuyển qua môi trường tái sinh dao động từ 48,1% (CT5) đến 70,23% (CT2). Trong khi đó, CT1 (không lây nhiễm với vi khuẩn) có tỷ lệ mẫu sống là 100%. Bên cạnh đó, khả năng tái sinh tạo chồi, tạo rễ, cũng như các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao, số lá của chồi tái sinh cũng giảm đi rõ rệt trên

các công thức có lây nhiễm với vi khuẩn *A.tumefaciens*. Trong các công thức thí nghiệm, CT2 cho tỷ lệ tạo chồi và hệ số tạo chồi là cao nhất. Bên cạnh đó, cụm chồi tái sinh ở CT2 có chất lượng tốt, chồi có màu xanh, cao, sinh trưởng mạnh.

Việc nhỏ trực tiếp dung dịch vi khuẩn *A.tumefaciens* lên callus đã làm giảm rõ rệt tỷ lệ sống, khả năng tái sinh của callus cũng như sinh trưởng của các chồi tái sinh. Ở CT3 và CT5 thấy rõ sự phát triển rất mạnh của vi khuẩn *A.tumefaciens* xung quanh callus sau 5

ngày đồng nuôi cấy. Sự cạnh tranh môi trường và tăng sinh quá mức của vi khuẩn khi đồng nuôi cấy là nguyên nhân của kết quả nêu trên. Mặc dù vậy, ở các công thức thí nghiệm này lại cho sự biểu hiện gen GFP là khá cao và đạt tỷ lệ 83,33% mẫu sống ở CT3.

Gen *GFP* chỉ được biểu hiện ở callus và rễ mà không biểu hiện ở chồi tái sinh. Có thể chồi tái sinh đã không tái sinh từ các callus đã được chuyển gen *GFP* hoặc gen *GFP* đã không được biểu hiện ở các loại mô khác ngoài callus và rễ.

Bảng 4. Ảnh hưởng của phương pháp lây nhiễm đến khả năng tái sinh mẫu và chuyển gen (sau 8 tuần)

CT	Tỷ lệ mẫu sống sau tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Chiều cao TB cây (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Số cây/mẫu cấy (cây)	Biểu hiện gen <i>GFP</i> (%)		
							Callus	Cây	
								Chồi	Rễ
1 (Đ/C)	100,00	100,0	100,0	7,8	3,2	6,5	0,00	0	0,00
2	70,23	93,3	100,0	4,7	2,9	4,5	66,67	0	75,00
3	63,53	90,3	74,2	3,5	2,3	3,8	83,33	0	47,37
4	58,33	75,9	72,4	3,5	2,2	2,8	33,33	0	31,58
5	48,10	80,0	43,3	2,5	2,1	1,7	36,84	0	41,67
6	53,33	86,7	73,3	3,2	2,0	2,3	30,00	0	30,77
CV%				4,8	4,5	5,5			
LSD _{0,05}				0,24	0,1	0,23			

Ghi chú:

Tỷ lệ tạo chồi, tạo rễ được tính theo số mẫu sống sau khi tái sinh

CT1: Đối chứng (không lây nhiễm với vi khuẩn).

CT2: Mẫu được cắt trên giấy thấm, sau đó ngâm trong dung dịch vi khuẩn trong 5 phút.

CT3: Mẫu được cắt trên giấy thấm, sau đó nhỏ dung dịch vi khuẩn lên mẫu cấy.

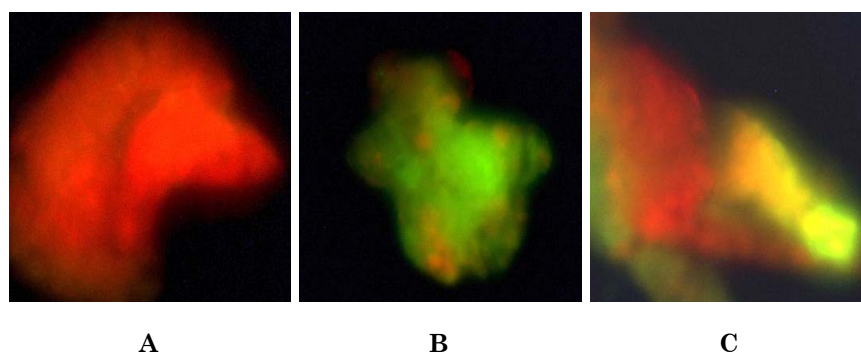
CT4: Mẫu được cắt trong môi trường đồng nuôi cấy, sau đó ngâm trong dung dịch vi khuẩn trong 5 phút.

CT5: Mẫu được cắt trong môi trường đồng nuôi cấy, sau đó nhỏ dung dịch vi khuẩn lên mẫu cấy.

CT6: Cắt và ngâm mẫu trong dung dịch vi khuẩn trong 5 phút.

Đánh giá tổng hợp về khả năng sống, tái sinh và sự biểu hiện gen *GFP* của mô callus sau khi lây nhiễm với vi khuẩn *A.tumefaciens*, chúng tôi nhận thấy CT2 là công thức cho hiệu

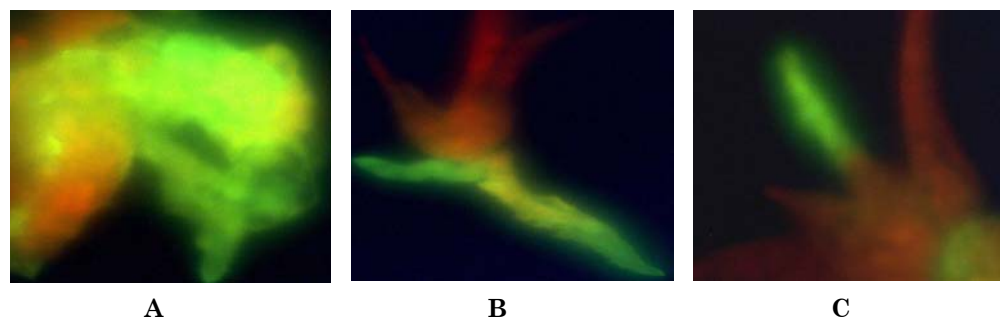
quả cao nhất. Như vậy, ở giai đoạn lây nhiễm, có thể sử dụng phương pháp cắt mẫu trên giấy thấm sau đó ngâm mẫu cấy trong dung dịch vi khuẩn *A.tumefaciens* trong 5 phút.



Hình 4. Sự biểu hiện gen *GFP*
(A) không biểu hiện, (B) biểu hiện trên callus, (C) biểu hiện trên rễ

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến khả năng tái sinh mẫu và chuyển gen (sau 8 tuần)

Công thức	Thời gian lây nhiễm (ngày)	Tỷ lệ mẫu sống sau tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Chiều cao TB cây (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Số chồi/mẫu cây (cây)	Tỷ lệ biểu hiện gen <i>GFP</i>		
								Callus (%)	Chồi (%)	Rễ (%)
1 (Đ/C)	Không lây nhiễm	100	100	100	4,5	3,0	5,5	0	0	0
2	3	70,32	90,00	80,0	2,2	2,1	3,2	68,42	7,50	60,00
3	5	54,02	83,33	63,3	2,0	2,0	2,4	63,16	5,13	61,54
4	7	48,10	70,00	46,7	1,4	1,7	2,2	57,14	5,00	52,50
CV%					4,5	5,0	5,1			
LSD _{0,05}					0,14	0,13	0,2			



Hình 5. Sự biểu hiện của gen *GFP* trên: A - callus, B - rễ, C - lá

Thời gian lây nhiễm chính là thời gian đồng nuôi cấy giữa vi khuẩn và callus để vi khuẩn *A.tumefaciens* thực hiện quá trình chuyển gen vào tế bào thực vật. Qua bảng 5 nhận thấy: thời gian đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A.tumefaciens* càng dài thì tỷ lệ mẫu sống, khả năng tái sinh tạo chồi, tạo rễ của callus càng giảm. Tỷ lệ sống của callus đã giảm từ 100% ở công thức đối chứng xuống còn 70,32% ở công thức đồng nuôi cấy trong thời gian 3 ngày (CT2) và chỉ còn 48,1% ở công thức có thời gian đồng nuôi cấy là 7 ngày (CT4). Tỷ lệ tái sinh tạo chồi đạt 90% ở CT2 và giảm xuống còn 70% ở CT4. Bên cạnh đó, các chỉ tiêu về số chồi tái sinh, chiều cao cây, số lá trung bình đều giảm khi tăng thời gian đồng nuôi cấy.

Theo dõi thí nghiệm cho thấy, các công thức CT3 và CT4 có sự phát triển mạnh của vi khuẩn *A.tumefaciens* (vòng khuẩn nhìn rõ, sinh khối vi khuẩn nhiều) lại cho tỷ lệ mẫu có biểu hiện gen *GFP* ít hơn so với CT2 (vòng khuẩn mờ, sinh khối vi khuẩn ít). Tỷ lệ mẫu có biểu hiện gen ở CT2 là cao nhất và đạt 68,42% ở callus, 7,5% ở chồi và 60% ở rễ. Đây là công thức có tỷ lệ mẫu biểu hiện gen khá cao và đặc biệt là đã thu được các chồi tái sinh có biểu hiện của gen *GFP* trên lá (một vài lá hoặc một phần lá cây) để hình thành thể khảm. Rõ ràng thời gian đồng nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng chuyển gen của vi khuẩn *A.tumefaciens* vào callus của hoa loa kèn. Thời gian đồng nuôi cấy giữa callus và vi khuẩn *A.tumefaciens* thích hợp là 3 ngày.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được môi trường tái sinh thích hợp, đồng thời bước đầu nghiên cứu chuyển gen *GFP* (green fluorescent protein) vào cây hoa loa kèn trắng *Lilium longiflorum* với các kết quả sau:

Có thể sử dụng môi trường MS bổ sung 8% đường sucrose và 0,5 mg BA/lít + 0,5 mg

2,4D/lít làm môi trường tái sinh tạo callus từ vảy củ làm nguồn mô cho chuyển gen.

Môi trường thích hợp cho tái sinh tạo chồi từ callus hoa loa kèn là: MS + 2% đường sucrose + 0,25 mgBA/l.

Callus nên được nuôi cấy khởi động 5 ngày trước khi cho lây nhiễm với vi khuẩn *A.tumefaciens*.

Ở giai đoạn lây nhiễm, callus được cắt trên giấy thấm sau đó ngâm trong dung dịch vi khuẩn *A.tumefaciens* trong 5 phút. Thời gian lây nhiễm (đồng nuôi cấy) giữa callus và vi khuẩn *A.tumefaciens* thích hợp là 3 ngày.

Gen *GFP* đã biểu hiện trên callus cũng như ở rễ và chồi của cây tái sinh từ callus. Sự biểu hiện của gen *GFP* là tương đối rõ, tỷ lệ biểu hiện từ 52,38 - 62,5% ở callus, 31,25 - 52,94% ở rễ và 1,25% trên chồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lý Anh, Đinh Trường Sơn, Bùi Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hương (2007). Nghiên cứu chuyển gen GFP vào cây *Lilium* Oriental hybrid "Siberia". Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. NXB. Nông nghiệp, 2007, tr.195-202.
- Dương Tấn Nhựt (1994). Nhân giống Huệ Tây bằng phương pháp nuôi cấy vảy củ. *Tạp chí Sinh học* 3/1994, tr.29 - 30.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Lý Anh (2006). Cảm ứng tạo callus và tái sinh chồi từ callus ở cây hoa loa kèn *Lilium formolongo* làm cơ sở cho công tác chọn tạo giống bằng kỹ thuật chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 3(4),tr.495-502.
- Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Quang Thạch (2008). Developing an Agrobacterium - mediated transformation system for *lilium* × *formolongo* thin cell layer of bulb scales. *Tạp chí Khoa học và*

- phát triển* - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, số đặc biệt, 4/2008, tr.123- 128.
- Clive J.(2008). Reporte on global status of biotech/GM crops. Brief 39. International service for the acquisition of Agri-Biotech applications. <http://www.isaaa.org>.
- Hoshi Y., M.Kondo, S.Mori, Y.Adachi, M.Nakano, H.Kobayashi (2004). Production of transgenic lily plants by Agrobacterium - mediated transformation, *Plant Cell Rep.* 22:359-364.
- Hoshi Y., Kondo M., Kobayashi H., Mori S., Nakano M. (2005). Agrobacterium-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Acta Hort* 673, vol 2: 543-547.
- Mercuri A., L.De Benedtti, S.Bruna, R.Begliano, C.Bianchini, G.Foglia, T.Schiva. Agrobacterium - mediated transformation with rol genes of *Lilium longiflorum* Thumb. *ISHS Acta Horticulturae* 612.
- Ogaki M., Furuichi Y., Kuroda K., Chin D. P.; Ogawa Y., Mil M. (2008). Importance of co-cultivation medium pH for successful Agrobacterium - mediated transformation of *Lilium × formolongo*. *Plant cell reports* 2008, vol. 27, no4, pp. 699-705.
- Watada A. , Yun D. J., Matsumoto T., Niu X., Wu Y., Kononowicz A. K., Bressan R. A. , Hasegawa P. M. (1998). Microprojectile bombardment - mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant cell reports* , vol. 17, no4, pp. 262-267 (37 ef.).