

STUDY IN VITRO REGENERATION AND TRANSFORMATION SYSTEMS OF CUCUMBER VARIETY CHOKA F1 USING GUS REPORTER GENE

Hoang Thi Huyen Trang¹, Hoang Khanh Linh⁴, Nguyen Thi Linh¹, Trinh Dinh Duy¹,
Le Thi Nhu Thao^{1,2,3}, Pham Bich Ngoc^{1,2}, Chu Hoang Ha^{1,2}, Do Tien Phat^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology – VAST, ²Graduate University of Sciences and Technology – VAST,

³Nam Bo Agriculture College, ⁴VNU - Foreign Language Specialized School

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 09/01/2021	This study was performed to establish and develop efficient procedures for <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation and regeneration of an inbred cucumber cultivar, which provides a potential protocol to transfer gene of interest into cucumber as well as further research on genome editing in cucumber in Vietnam. In this procedure, cucumber seed sterilization was well performed using 15% NaClO for 15 min. The frequency of multiple shoot induction was 61.76% and the number of regenerated shoots per sample was 2.45 on MS basal medium added 1.5 mg/L BAP and 1 mg/L ABA. The rooting frequency ranged from 45% to 85% and the whole regenerated plants were formed on MS medium supplemented with 20 g/L sucrose. The <i>in vitro</i> regenerated cucumber plants were successfully transferred and grown on vermiculite under greenhouse conditions with a survival rate of 66.67%. These medium components and the regeneration procedure were successfully utilized to transfer <i>gus</i> reporter gene into the Choka F1 variety using the <i>Agrobacterium</i> -mediated method. The GUS staining and PCR analysis using specific primers demonstrated the presence and expression of <i>gus</i> gene in transgenic cucumber lines. The transformation frequency was preliminary recorded at 9.44%.
Revised: 18/01/2021	
Published: 20/01/2021	
KEYWORDS	
Cucumber	
Regeneration	
<i>A. tumefaciens</i>	
Transformation	
Choka F1	

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH VÀ CHUYỂN GEN CHỈ THỊ VÀO GIỐNG DƯA CHUỘT CHOKA F1

Hoàng Thị Huyền Trang¹, Hoàng Khánh Linh⁴, Nguyễn Thị Linh¹, Trịnh Đình Duy¹,
Lê Thị Như Thảo^{1,2,3}, Phạm Bích Ngọc^{1,2}, Chu Hoàng Hà^{1,2}, Đỗ Tiến Phát^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Cao đẳng Nông nghiệp Nam Bộ, ⁴Trường THPT Chuyên Ngoại ngữ - ĐH Quốc gia Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 09/01/2021	Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích phát triển quy trình tái sinh và chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> ở cây dưa chuột tạo cơ sở cho nghiên cứu chuyển các gen mục tiêu mang các tính trạng quý cũng như chỉnh sửa hệ gen trên các giống dưa chuột tại Việt Nam. Trong quy trình này, điều kiện khử trùng phù hợp là sử dụng NaClO 15% trong thời gian 15 phút. Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi đạt 61,76% và số chồi trung bình đạt 2,45 chồi/ cụm mẫu cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP và 1 mg/L ABA. Tỷ lệ chồi phát sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh dao động từ 45% đến 85% trên môi trường cơ bản MS với 20 g/L sucrose. Cây con được chuyển ra, thích nghi và sinh trưởng trong điều kiện nhà lưới đạt tỷ lệ sống 66,67% trên giá thể vermiculite. Thành phần môi trường và các bước tái sinh được sử dụng trong biến nạp gen chỉ thị <i>gus</i> vào giống dưa chuột Choka F1 thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> . Sự có mặt và biểu hiện của gen chỉ thị <i>gus</i> trong các dòng dưa chuột chuyển gen được khẳng định thông qua phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu và phương pháp nhuộm GUS, tỷ lệ chuyển gen bước đầu ghi nhận đạt 9,44%.
Ngày hoàn thiện: 18/01/2021	
Ngày đăng: 20/01/2021	
TỪ KHÓA	
Dưa chuột	
Tái sinh	
<i>A. tumefaciens</i>	
Chuyển gen	
Choka F1	

* Corresponding author. Email: dtphat@ibt.ac.vn

1. Đặt vấn đề

Dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) thuộc họ bầu bí *Cucurbitaceae*, là cây trồng đem lại giá trị kinh tế cao và được trồng ở nhiều nước trên thế giới. Đây là một trong những họ thực vật quan trọng cung cấp thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cho con người. Theo FAOSTAT, dưa chuột được trồng ở nhiều khu vực; trong đó, nhiều nhất là châu Á với diện tích canh tác hơn 1,4 triệu ha và sản lượng đạt 70,6 triệu tấn, sản xuất lớn tập trung ở Trung Quốc và Ấn Độ [1]. Tại Việt Nam, dưa chuột được trồng nhiều ở vùng đồng bằng sông Hồng với diện tích hàng năm dao động khoảng 10.000 ha và sản lượng bình quân đạt 300.000 tấn [2]. Đây là cây rau truyền thống, được trồng lâu đời và chiếm vị trí quan trọng trong sản xuất ở nước ta [3].

Dưa chuột là cây trồng mẫn cảm với sương giá, yêu cầu khí hậu ẩm áp để sản xuất, khó thích ứng với các điều kiện bất thuận như hạn và úng [4], [5]. Điều này đã hạn chế tiềm năng phát triển của cây dưa chuột. Cùng với đó, tình hình dịch bệnh trên cây trồng đang diễn biến phức tạp, sản xuất dưa chuột phải đối mặt với nhiều bệnh hại gây ra bởi nấm, virus và vi khuẩn gây thiệt hại lớn về năng suất cũng như hiệu quả kinh tế [6]. Vì vậy, việc tạo ra các giống dưa chuột có năng suất cao, ổn định, khả năng thích nghi phổ rộng với điều kiện thời tiết, khí hậu là cần thiết, đặc biệt là nhu cầu mở rộng đất canh tác tới những vùng có điều kiện tự nhiên không thuận lợi.

Ứng dụng công nghệ sinh học trong tạo giống cây trồng đang được ưu tiên phát triển hàng đầu hiện nay, giúp nâng cao hiệu quả, đồng thời rút ngắn thời gian và chi phí cho quá trình chọn tạo giống. Việc chuyển, tích hợp và chỉnh sửa thành công vật liệu di truyền vào hệ gen của cây dưa chuột có thể cải thiện khả năng kháng bệnh cũng như tính chống chịu của các giống mục tiêu [7]. Điều này mở ra tiềm năng cải tiến những tính trạng quan trọng và tạo ra các tính trạng quý mới trên dưa chuột mà khó có thể đạt được thông qua các phương pháp chọn tạo giống truyền thống [8]. Để ứng dụng thành công công nghệ sinh học trong cải biến giống cây trồng, một yêu cầu cần thiết và quan trọng là việc xây dựng và hoàn thiện một quy trình tái sinh và chuyển gen với hiệu suất cao. Hiện nay, phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được xem là phương pháp hiệu quả trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Phương pháp này đòi hỏi khả năng lây nhiễm của *A. tumefaciens* và khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh từ một tế bào, mô biến nạp riêng lẻ thông qua nuôi cấy *in vitro* [9]. Nhiều nghiên cứu đã công bố về việc chuyển gen thành công trên cây dưa chuột nhưng chỉ một số ít đạt được hiệu suất chuyển gen cao và thu được cây thế hệ tiếp theo [7]. Trulson đã tạo ra cây dưa chuột chuyển gen đầu tiên biểu hiện gen *nptII* bằng cách lây nhiễm trực tiếp dưới lá mầm với *Agrobacterium rhizogenes*, tuy nhiên phương pháp này có tỉ lệ tái sinh thấp [10]. Hiện nay, mảnh lá mầm được sử dụng làm vật liệu hiệu quả trong biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* trên đối tượng dưa chuột [11]. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển nạp gen được khẳng định phụ thuộc rất nhiều vào các giống dưa chuột sử dụng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn giống dưa chuột đang được sử dụng trong sản xuất để xây dựng và phát triển quy trình tái sinh và chuyển gen. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tái sinh bao gồm cách thức khử trùng hạt, thành phần môi trường tái sinh, nồng độ các chất kích thích sinh trưởng,... đã được tối ưu hóa và hệ thống tái sinh từ mảnh lá mầm dưa chuột được sử dụng trong chuyển gen chỉ thị *gus* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vào giống dưa chuột nghiên cứu. Kết quả đạt được trong nghiên cứu này là tiền đề cho việc ứng dụng công nghệ sinh học, đặc biệt là công nghệ chỉnh sửa hệ gen trong công tác chọn tạo giống dưa chuột trong tương lai.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thực vật: Sử dụng hạt giống dưa chuột Choka F1 do công ty C.H Việt Nam phân phối trên thị trường Hà Nội phục vụ nghiên cứu. Đây là giống dưa chuột có nguồn gốc từ Nhật Bản với ưu điểm là thời gian cho quả ngắn và thời gian thu hoạch kéo dài.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 và vector pZY102 mang gen chỉ thị *gus* do Đại học Missouri, Hoa Kỳ cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường MS cơ bản, sucrose (30g/L), agar (7,5g/L) [12] và các chất điều tiết sinh trưởng như BAP, ABA tùy theo giai đoạn nuôi cấy.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu khả năng tái sinh in vitro thông qua mảnh lá mầm

Hạt dừa chuột thu về được khử trùng bằng NaClO 15% trong 15 phút, rửa lại 3 lần bằng nước cất khử trùng. Ngâm hạt trong nước cất khử trùng từ 2 – 3 h giúp hạt hút nước để loại bỏ lớp vỏ ngoài và đồng thời tăng sức nảy mầm của hạt. Dùng panh, dao khử trùng tách vỏ hạt và đặt lên môi trường nảy mầm (MS + 30 g/L sucrose + 7,5 g/L agar, pH 5,8), nuôi trong điều kiện tối, nhiệt độ 24 – 25°C, trong 48 giờ. Các mảnh lá mầm 2 ngày tuổi được sử dụng làm nguyên liệu tái sinh và chuyển gen.

Các mảnh lá mầm không chứa đỉnh sinh trưởng được đặt lên 4 công thức môi trường có bổ sung BAP và ABA với các nồng độ khác nhau, 2 tuần cấy chuyển 1 lần sang môi trường mới. Sau 2 – 4 lần cấy chuyển, những khối mô tốt (màu xanh đậm, không mọng nước) được chuyển sang môi trường với nồng độ BAP, ABA tương ứng. Khi cụm đa chồi hình thành, tiếp tục chuyển lên môi trường nảy mầm (MS + 30g/L sucrose), tái sinh cây và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới.

2.2.2. Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của dừa chuột

Tạo dịch huyền phù *A. tumefaciens*: Vi khuẩn được lấy từ -80°C cấy vạch trên môi trường YEP (đặc) có bổ sung kháng sinh, đĩa khuẩn được nuôi ở 28°C trong 48 giờ. Sau 48 giờ phục hồi trên đĩa thạch, tiến hành thu sinh khối khuẩn và chuyển vào 5 ml môi trường YEP lỏng có bổ sung kháng sinh, nuôi lắc 200 vòng/ phút, 28°C trong thời gian 5 – 6 giờ. Tiếp tục phục hồi khuẩn với thể tích 100ml, nuôi lắc qua đêm trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào, hòa tan trong môi trường ½ MS có bổ sung AS 200 µM tạo dịch huyền phù sử dụng cho biến nạp.

Lá mầm từ hạt sau hai ngày cấy trên môi trường nảy mầm được tách bỏ phần đỉnh sinh trưởng và cuống lá và tạo tổn thương. Các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* ($OD_{600nm} = 0,5$) trong thời gian 15 phút, thấm bớt dịch khuẩn và đặt trên môi trường đồng nuôi cấy trong thời gian 2 ngày. Tiếp theo, mẫu được rửa khuẩn và chuyển lên môi trường 1,5 mg/L BAP + 1 mg/L ABA có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn và chất chọn lọc trong 6 – 8 tuần, cấy chuyển 2 tuần 1 lần. Đánh giá biểu hiện của gen chỉ thị sau 5, 10 ngày đồng nuôi cấy.

2.2.3. Đánh giá hiệu quả chuyển gen

Kiểm tra sự có mặt của gen *gus* trong cây theo phương pháp nhuộm tế bào học (nhuộm *GUS*) của Jefferson và đồng tác giả [13]: Các mảnh lá được nhuộm với dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide từ 10 – 12 giờ trong điều kiện tối, nhiệt độ 37 °C. Sau đó rửa bằng cồn 70%, những vùng có biểu hiện của gen *gus* chuyển màu xanh lam. Hiệu quả chuyển gen được xác định dựa trên các mẫu có biểu hiện màu xanh lam trên tổng số mẫu kiểm tra, mức độ tiếp nhận được đánh giá thông qua màu sắc và vùng biểu hiện.

2.2.4. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển thông qua phản ứng PCR

DNA tổng số được tách từ lá của các dòng dừa chuột ra rễ trên môi trường chọn lọc sử dụng phương pháp CTAB có cải tiến dựa trên quy trình của Doyle and Doyle [14]. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu *gus* exon 2- F (5'- GTAGAAACCCCAACCCGTGA – 3') và *gus*- R (3'- GCTTTTCTTGCCGTTTTCG- 5') để xác định sự có mặt của gen *gus* trong các dòng dừa chuột chuyển gen bằng phản ứng PCR. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

2.2.5. Xử lý số liệu

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 30 mẫu với 3 lần nhắc lại. Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Excel 2013.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo vật liệu nghiên cứu

Quá trình khử trùng mẫu tạo nguyên liệu ban đầu cho tái sinh *in vitro* là bước quan trọng và có ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng của nguyên liệu đầu vào. Do các loại mẫu khác nhau mang các nguồn bệnh khác nhau (nấm, vi khuẩn...), thêm vào đó khả năng chống chịu với các hóa chất và phương pháp khử trùng là khác nhau. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu lựa chọn 2 phương pháp khử trùng là dạng khí chlorine và dung dịch tẩy rửa (NaClO) với thời gian khử trùng khác nhau. Các chế độ khử trùng khác nhau đã cho hiệu quả nảy mầm khác nhau rõ rệt (Bảng 1).

Với phương pháp khử trùng bằng khí chlorine, các đĩa hạt được mở và đặt trong bình hút ẩm bằng thủy tinh có chứa lọ dung dịch khử trùng gồm: 15 mL NaClO, bổ sung từ từ 2 mL HCl 12N, đóng nhanh nắp bình, niêm phong bằng giấy nến và được đặt trong tủ hút an toàn sinh học. Hạt giống được khử trùng trong thời gian từ 1 – 2 giờ, đĩa hạt sau khi khử trùng sẽ được đóng nắp và chuyển vào tủ cấy vô trùng. Hạt được gieo trên môi trường MS, tại 24 – 25°C, trong tối.

Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng nảy mầm của hạt

Hóa chất	Phương pháp	Thời gian (phút)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Thời gian nảy mầm (ngày)
HCl: NaClO (2ml : 15ml)	KT1	60	76,67	4
	KT2	90	73,33	4
	KT3	120	56,67	6
	KT4	5	83,33	2
NaClO (15%)	KT5	15	86,67	2
	KT6	30	80	3

Phương pháp sử dụng khí Cl₂ (HCl : NaClO) trong bình hút ẩm cho tỉ lệ nảy mầm đạt 56,67% (KT3) đến 76,67% (KT1) với thời gian bắt đầu nảy mầm là 4 ngày sau gieo đối với KT1, KT2 và 6 ngày sau gieo (KT3). Khi sử dụng NaClO (15%) đã rút ngắn được thời gian nảy mầm của hạt (2 – 3 ngày sau gieo) và tỉ lệ nảy mầm đạt trên 80%, cao nhất tại KT5 (86,67%, hạt nảy mầm sau 2 ngày). Tỉ lệ nảy mầm và thời gian nảy mầm có sự chênh lệch có thể do phương pháp sử dụng dung dịch NaClO (15%) để lách hạt đã làm lớp vỏ ngoài của hạt mềm hơn đồng thời hạt hút được nhiều nước hơn.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tạo đa chồi của dưa chuột

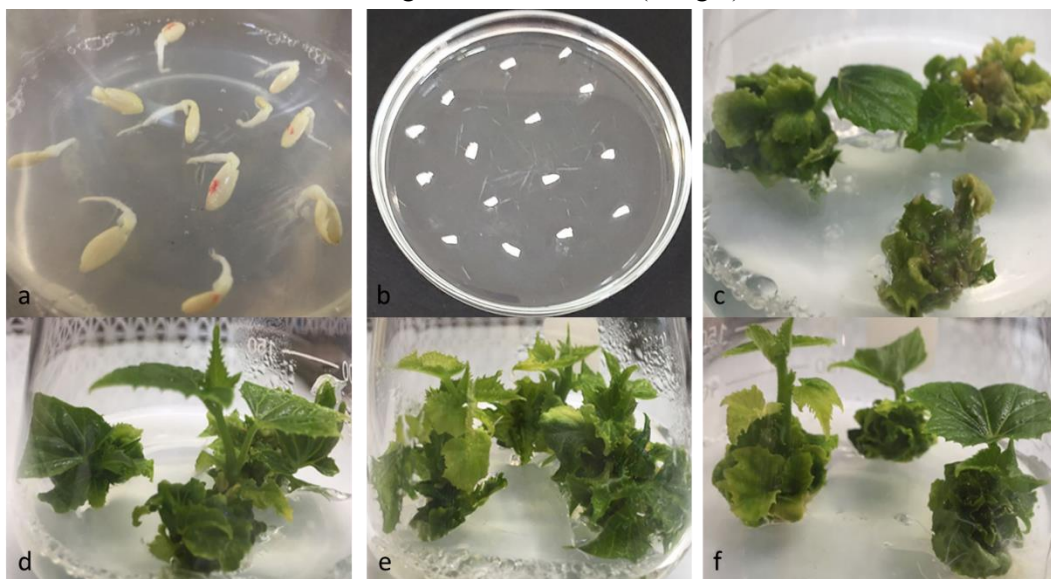
Quy trình tái sinh được thực hiện theo phương pháp của Zhenxian Zhang và cộng sự có cải tiến [7]. Các mảnh lá mầm được loại bỏ đỉnh sinh trưởng và cắt thành mảnh (0,3*0,3 cm) đặt trên môi trường MS có bổ sung BAP, ABA với các nồng độ khác nhau. Kết quả theo dõi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tạo đa chồi của mảnh lá mầm dưa chuột

Công thức	Số mẫu	BAP (mg/L)	ABA (mg/L)	Tỉ lệ tạo đa chồi (%)	Số chồi/cụm đa chồi	Tỉ lệ chồi ra rễ (%)
CT1	170	1,5	0	50,58±2,64	1,35±0,48	72,5±5
CT2	170	1,5	1,0	61,76±4,23	2,45±0,48	85±5,78
CT3	170	1,5	1,5	40±2,71	1,1±0,43	45±5,78
Đối chứng	40	0	0			

Kết quả thí nghiệm cho thấy khi đặt trên môi trường tạo đa chồi: Sau khoảng 7 – 10 ngày các mảnh lá bắt đầu tạo mô sẹo tại các vị trí tổn thương tùy thuộc vào từng công thức thí nghiệm CT1, 3 đa chồi tạo từ vị trí rách lá mầm cho tỉ lệ tạo đa chồi lần lượt $81,17 \pm 2,64$ và $65,29 \pm 2,71$; CT2 đa chồi tạo xung quanh mép lá có tỉ lệ tạo đa chồi cao nhất $88,82 \pm 4,23$. Các mảnh hình thành mô sẹo tiếp tục được chuyển sang môi trường mới tương ứng, sau 19 – 21 ngày các chồi xanh bắt đầu xuất hiện, các chồi này dài ra nhanh chóng sau 3 – 5 ngày chồi đạt được chiều cao khoảng 2 – 3 cm (Hình 1).

Các chồi đạt được chiều dài 2 – 3 cm thì bản thân cụm đa chồi cũng bắt đầu xuất hiện rễ, hiện tượng này xảy ra có thể do hoạt động của hooc môn nội sinh. Tiếp theo, các chồi được cắt ra và chuyển lên môi trường MS + 20 g/L sucrose, sau 3 – 5 ngày rễ bắt đầu xuất hiện, khi các cây đạt chiều cao từ 5 – 7 cm sẽ được đưa ra ngoài huấn luyện thích nghi với môi trường trước khi đưa cây ra nhà lưới. Tỷ lệ chồi tạo rễ cao nhất (85%) với các chồi tạo được từ công thức nhân CT2. Như vậy chất điều tiết sinh trưởng có ảnh hưởng đặc biệt quan trọng trong cảm ứng tạo đa chồi, nhưng khả năng tạo đa chồi không tỉ lệ thuận theo nồng độ chất điều tiết sinh trưởng, đặc biệt khi tăng nồng độ ABA (1,5 mg/L – CT3) có ảnh hưởng không tốt đến tỉ lệ tạo đa chồi cũng như số chồi/cụm đa chồi. Nồng độ các chất điều tiết sinh trưởng không chỉ tác động đến giai đoạn tạo đa chồi mà còn tác động kéo dài đến giai đoạn ra rễ của các chồi trong thí nghiệm dẫn đến khả năng phát sinh rễ của các chồi trên mỗi công thức là khác nhau (Bảng 2).



Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tạo đa chồi của mảnh lá mầm dưa chuột
a. Hạt nảy mầm sau 2 ngày, b. Mảnh lá mầm kích thước 0,3*0,3 cm, c. Đối chứng, d. CT1, e. CT2, f. CT3

3.3. Huấn luyện cây con

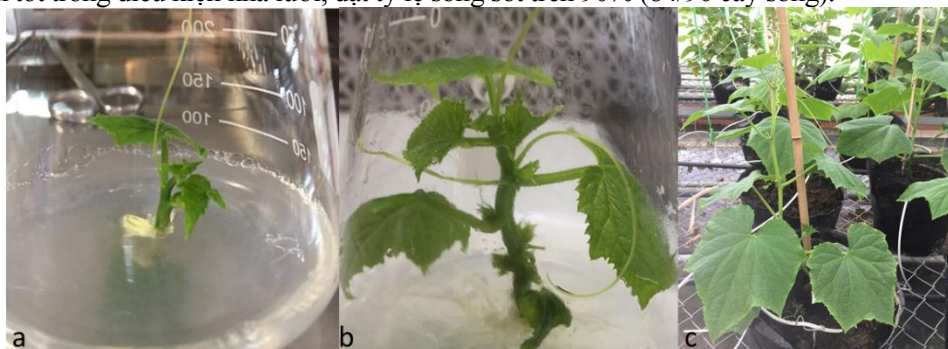
Với mục đích hoàn thiện quy trình tái sinh, tạo cây hoàn chỉnh nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo, hệ thống tái sinh không chỉ dừng lại ở giai đoạn tạo cây *in vitro* mà tiếp tục được hoàn thiện chuyển cây ra nhà lưới.

Cây dưa chuột trước khi đưa ra ngoài môi trường phải trải qua giai đoạn huấn luyện trong buồng sinh trưởng bằng cách trồng trên 3 loại giá thể 100% giá thể trơ (vermiculite), 50% Tribat : 50% giá thể trơ, 50% Tribat : 25% giá thể trơ : 25% xơ dừa.

Bảng 3. Tỷ lệ cây con sống trên ba công thức giá thể

Giá thể	Số mẫu	Tỷ lệ cây sống (%)
100% giá thể tro	45	66,67±6,67
50% Tribat : 50% giá thể tro	45	33,33±3,84
50% Tribat : 25% giá thể tro : 25% xơ dừa	45	20±3,85

Từ 135 cây dưa chuột hoàn chỉnh đưa ra giá thể, kết quả thu được cho thấy khi sử dụng 100% giá thể tro cho tỷ lệ cây sống sót là cao nhất đạt 66,67%. Việc bổ sung Tribat và xơ dừa vào giá thể giúp cho giá thể có khả năng giữ nước tốt hơn, tuy nhiên lại gây hiện tượng váng đọng nước khiến tỷ lệ cây sống thấp nhất (Bảng 3). Cây non sau 3 tuần huấn luyện đã có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh được chuyển sang bầu chứa đất phù sa và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới (Hình 2). Cây sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện nhà lưới, đạt tỷ lệ sống sót trên 90% (84/90 cây sống).

**Hình 2.** Cây dưa chuột hoàn chỉnh

a. Chồi dưa chuột trên môi trường ra rễ MS 3 ngày b. Chồi dưa chuột trên môi trường ra rễ MS 10 ngày
c. Cây dưa chuột ngoài nhà lưới

3.4. Kết quả chuyển gen *gus*

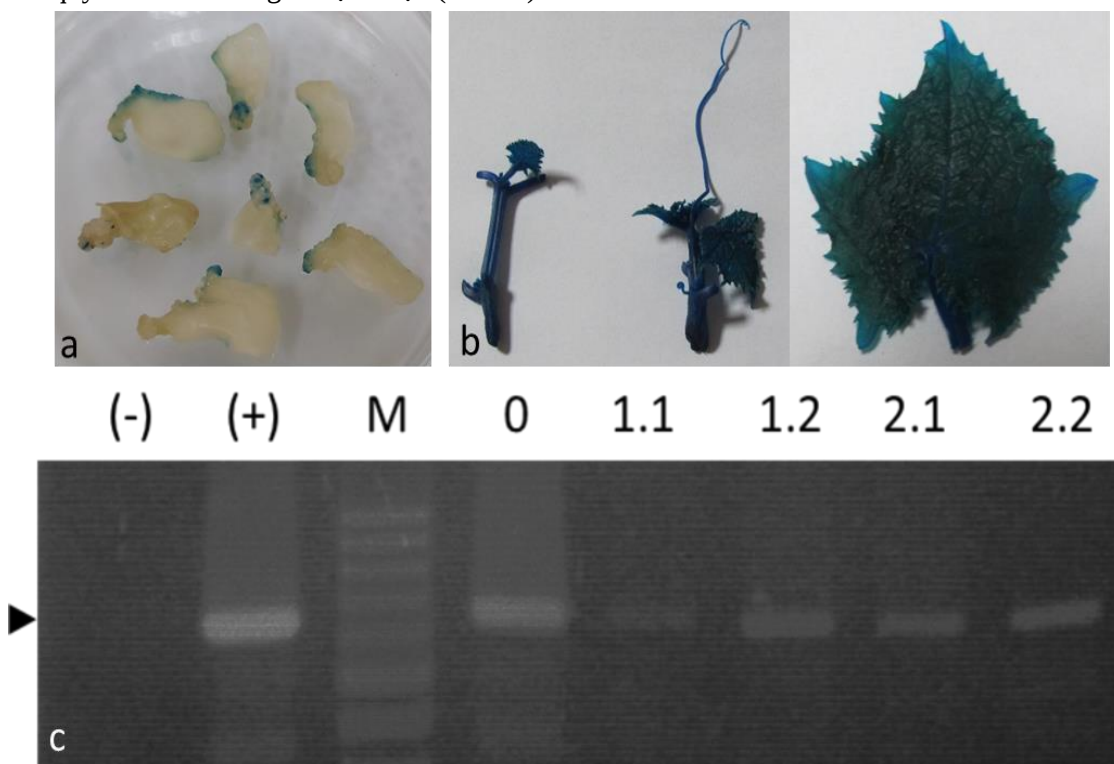
Hoàn thiện quy trình tái sinh là bước đầu tiên trong quy trình chuyển gen, nhưng để kiểm tra hiệu quả chuyển gen vào trong đối tượng thực vật thì việc tạo dựng quy trình chuyển gen là nhân tố then chốt. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã thí nghiệm sử dụng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 chứa vector pZY102 mang gen chỉ thị *gus* và gen chọn lọc *bar* để chuyển vào cây dưa chuột nhằm tạo dựng một quy trình chuyển gen hiệu quả cho giống dưa chuột ở Việt Nam.

Từ kết quả nghiên cứu về tái sinh dưa chuột, nhóm nghiên cứu áp dụng tương tự nguyên liệu và môi trường nuôi cấy trong việc chuyển gen *gus* vào trong mảnh lá mầm. Vật liệu sử dụng biến nạp là các mẫu lá mầm 2 ngày tuổi, được loại bỏ đỉnh sinh trưởng và cắt thành từng mảnh có kích thước 0,3 * 0,3 cm. Lây nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* ($OD_{600nm} = 0,25$) trong thời gian 30 phút, mỗi 10 phút lắc nhẹ mẫu 1 lần, gạt bớt dịch khuẩn và chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy có bổ sung AS 200 μ M trong thời gian 48 giờ tại nhiệt độ 24 – 25 °C, trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau đồng nuôi cấy, mẫu được loại bỏ khuẩn bề mặt và chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc. Kết quả thống kê tỷ lệ tái sinh cây trên môi trường chọn lọc có bổ sung PPT 3 mg/L được thể hiện qua bảng 4.

Bảng 4. Kết quả chuyển gen *gus*

Thí nghiệm	Số mẫu	Mẫu tạo đa chồi (%)	Mẫu tái sinh chồi (%)	Tỷ lệ mẫu biểu hiện GUS (%)	
				Sau đồng nuôi cấy 10 ngày	Tỷ lệ chuyển gen
Pzy102	180	39,44±2,55	20,56±4,19	50,56±2,55	9,44±1,23
Đối chứng	30	83,33±5,67	66,67±4,23	0	0

Trên môi trường chọn lọc, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo đa chồi đạt 39,44% (Bảng 4). Sau 5 tuần chọn lọc, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi hoàn chỉnh đạt 20,56%. Những chồi tái sinh hoàn chỉnh được kiểm tra biểu hiện gen *gus* bằng phương pháp nhuộm X-gluc. Các mẫu lá và thân dưa chuột chuyển gen có biểu hiện màu xanh đặc trưng (Hình 3). Tỷ lệ chuyển gen chỉ thị dựa trên kết quả nhuộm GUS đạt 9,44%. Để khẳng định một lần nữa sự có mặt của gen *gus*, chúng tôi tiến hành thu mẫu ngẫu nhiên các dòng dưa chuột tái sinh hoàn chỉnh trên môi trường chọn lọc, tách DNA và kiểm tra với mỗi đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho thấy sự xuất hiện băng vạch đặc trưng của gen *gus* với kích thước khoảng 1003 bp ở các dòng dưa chuột chuyển gen. Mẫu thân lá của các dòng này tiếp tục được sử dụng để nhuộm GUS và kết quả cho thấy toàn bộ mẫu dương tính PCR với mỗi đặc hiệu đều có màu xanh đặc trưng. Kết quả này một lần nữa khẳng định sự ưu việt của môi trường chọn lọc cũng như hiệu quả chuyển gen của quy trình mà chúng tôi tạo được (Hình 3).



Hình 3. Kiểm tra sự có mặt và biểu hiện của gen *gus* trong các dòng dưa chuột chuyển gen
a. Kết quả nhuộm GUS mảnh lá sau 10 ngày biến nạp, b. Kết quả nhuộm GUS chồi, c. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen *gus*. Giếng (-): đối chứng âm (WT); Giếng (+): đối chứng dương (plasmid); Giếng 0- 2.2: các dòng dưa chuột chuyển gen; Giếng M: Marker DNA 1kb.

Từ những kết quả trên có thể thấy, chúng tôi đã xây dựng và hoàn thiện quy trình tái sinh cho giống dưa chuột Choka F1. Quy trình đã được sử dụng để chuyển thành công gen chỉ thị *gus* vào cây dưa chuột thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Việc sử dụng nguyên liệu là lá mầm làm vật liệu ban đầu giúp đơn giản công tác khử trùng và chủ động nguồn mẫu. Quy trình sử dụng môi trường MS cơ bản [12] giúp đơn giản hóa quá trình tái sinh và thời gian chuẩn bị so với công bố trước đây của Zhenxian Zhang và cộng sự [7]. Trong nghiên cứu đó, nhóm nghiên cứu đã phải phối hợp đồng thời hai loại môi trường MS và B5 trong suốt quy trình (môi trường B5 gieo hạt, môi trường MS tái sinh). Tuy nhiên tỷ lệ tạo đa chồi và số chồi hoàn chỉnh chỉ đạt lần lượt $61,76 \pm 4,23$ và $2,45 \pm 0,48$. Điều này cũng có thể lý giải bởi phản ứng khác nhau giữa các giống

với môi trường nuôi cấy. Bên cạnh đó, trong các nghiên cứu chuyển gen trên cây dưa chuột trước đó cũng cho thấy ảnh hưởng của giống tới hiệu quả chuyển gen [7],[15]. Với thử nghiệm đầu tiên trên giống Choka F1, chúng tôi thu được hiệu suất chuyển gen $9,44 \pm 1,23\%$. Sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển đã được kiểm chứng thông qua phản ứng PCR khuếch đại gen chỉ thị *gus* và biểu hiện *gus* ở các cây phân tích. Mặc dù vậy, cần có thêm các nghiên cứu trong thời gian tới nhằm phân tích và tối ưu các điều kiện chuyển gen để nâng cao hơn nữa hiệu suất chuyển gen với giống Choka F1 làm cơ sở để mở rộng nghiên cứu với các giống dưa chuột khác.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng và hoàn thiện quy trình tái sinh cây dưa chuột giống Choka F1 trong điều kiện *in vitro* với các điều kiện phù hợp bao gồm: Sử dụng NaClO 15%, trong thời gian 15 phút để khử trùng mẫu; môi trường tạo đa chồi được lựa chọn là MS bổ sung BAP, ABA ở các nồng độ lần lượt là 1,5 mg/L, 1 mg/L; môi trường MS + 20 g/L sucrose được dùng trong tạo cây hoàn chỉnh. Quy trình tái sinh này đã được thử nghiệm thành công trong chuyển gen chỉ thị vào cây dưa chuột giống Choka F1 với tỷ lệ chuyển gen đạt 9,44%. Đây là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong nghiên cứu chuyển gen và chỉnh sửa hệ gen trên cây dưa chuột.

Lời cảm ơn

Kinh phí dùng trong nghiên cứu được hỗ trợ bởi Đề tài Độc lập trẻ “Nghiên cứu nâng cao hàm lượng đường và amino acid trong quả cà chua (*solanum lycopersicum*) thông qua đột biến gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9”, chủ nhiệm đề tài TS. Đỗ Tiến Phát và Đề tài Nghiên cứu viên cao cấp “Phân tích trình tự nhóm gen mã hóa cho protein MLO liên quan đến tính kháng phấn trắng trên một số giống dưa chuột tại Việt Nam”, mã số NCVCC 08.06-20-20, chủ nhiệm đề tài PGS. TS. Chu Hoàng Hà. Nghiên cứu có sử dụng máy móc, trang thiết bị của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] FAOSTAT, 2018. [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. [Accessed Sept. 14, 2020].
- [2] General Statistics Office of Vietnam, "Statistical yearbook", 2019. [Online]. Available: <https://www.gso.gov.vn/en/data-and-statistics/2020/09/statistical-yearbook-2019/>. [Accessed Sept. 14, 2020].
- [3] T. T. Cuc, H. H. An, and N. T. B. Ha, *The vegetable curriculum*. Agricultural Publishing House, Hanoi, 2000, pp. 262-233.
- [4] N. Gupta, M. Rathore, and D. Goyary, "Marker-free transgenic cucumber expressing *Arabidopsis cbf1* gene confers chilling stress tolerance," *Biologia plantarum*, vol. 56, pp. 57-63, 2012.
- [5] T. K. Thi, "Research on characteristics of some cucumber varieties and their application in the breeding work in the Red River Delta," Doctoral thesis in Agriculture, Vietnam Agricultural Technical University, 1985.
- [6] Y. Tabei, S. Kitade, and Y. Nishizawa, "Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*)," *Plant Cell Reports*, vol. 17, pp. 159-164, 1998.
- [7] Z. Zhang, X. Li, and S. Ma, "A Protocol for *Agrobacterium*-mediated Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants", *Protocol Exchange*, 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/protex.2017.107>. [Accessed Sept. 14, 2020].
- [8] R. C. Gardner, "Gene transfer into tropical and subtropical crops," *Scientia horticulturae*, vol. 55, pp. 65-82, 1993.
- [9] G. Fang, and R. Grumet, "*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants," *Plant cell reports*, vol. 9, pp. 160-164, 1990.

-
- [10] A. J. Trulson, R. B. Simpson, and E. A. Shahin, "Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*," *Theoretical and applied genetics*, vol. 73, pp. 11-15, 1986.
- [11] S. Wang, S. S. Ku, and X. Ye, "Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.)," *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 14, pp. 469-482, 2015.
- [12] T. Murashige, and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [13] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan, "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants," *EMBO J.*, vol. 6, pp. 3901-3907, 1987.
- [14] J. J. Doyle, and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, pp. 39-40, 1990.
- [15] P. T. Quyen, N. T. T. Thao, and H. N. M. Nghia, "Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)," *Conference proceedings of National Biotechnology Conference 2020*, 2020, pp. 29-34.