KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TÁI SINH CỦA CẢI XANH (Brassica juncea) VÀ BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN NHỜ Agrobacterium tumefacien THÔNG QUA THẤM HÚT CHÂN KHÔNG (Vacuum Infiltration)

Nguyễn Lê Tú Trâm[1] *, Thái Hữu Phú*[2] *, Nguyễn Văn Uyển*[3]

Tóm tắt: *Lá mầm và trụ mầm từ cây cải xanh in vitro 7 ngày tuổi được gây nhiễm khuẩn **Agrobacterium tumefaciens** bằng máy hút chân không. Ở môi trường Murashige-Skoog (MS) có bổ sung benzyladenin (BA) 1 mg/l, naphthalene acetic acid (NAA) 1 mg/l và AgNO3 4 mg/l cho tỷ lệ chồi tái sinh cao nhất (95%) ở lá mầm; trong khi đó, ở trụ mầm, môi trường có bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất (64,1%) . Môi trường dùng để chọn lọc cây chuyển gen có chứa phosphinothricin (PPT) 3mg/l. Vi khuẩn được sử dụng cho thí nghiệm này là chủng **Agrobacterium tumefaciens** EHA 105 chứa plasmid ITB2 mang gen cryIA(c), gen **bar** và gen **gusA**. Các chồi tái sinh hình thành cây con và ra rễ được trên môi trường MS có chứa PPT 3mg/l, sau đó tiến hành kiểm tra các gen được chuyển vào cây con.*

lá mầm, trụ mầm, tái sinh, chuyển gene, thấm hút chân không

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Hạt giống cải xanh loại cao cây được cung cấp bởi Công ty giống cây trồng Trang Nông, Tp. Hồ Chí Minh.

Hạt cải xanh được lắc trong loại cồn 70% (1 phút), rửa sạch với nước cất vô trùng (3 lần). Tiếp theo, khử trùng hạt bằng nước javel có hoạt chất Hypochlorit Natrium 36 g/l (v/v) (15 phút). Cuối cùng, rửa sạch hạt bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Hạt được gieo trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 8 g/l agar. Các mẫu cây được đặt nuôi ở phòng tăng trưởng có ánh sáng 2500 lux (10 giờ/ngày), nhiệt độ 27 ± 2oC, ẩm độ 70%. Các lá mầm và trụ mầm sau 7 ngày được cô lập kích cỡ khoảng 1 cm dùng làm vật liệu thí nghiệm.

Môi trường tái sinh chồi từ lá mầm và trụ mầm

Sử dụng môi trường cơ bản MS có bổ sung 4 mg/l AgNO3, 30 g/l dường sucrose, 8 g/l agar và BA, NAA có nồng độ thay đổi, pH 5,8. Các mẫu cấy được đặt trong bình tam giác có dung tích 250 ml với 50 ml môi trường.

Thành phần các chất điều hòa tăng trưởng thực vật kết hợp trong môi trường tái sinh chồi từ lá mầm: BA 1, 2, 4 mg/l kết hợp NAA 1, 2 mg/l; đối với trụ mầm: BA 1, 2, 4 mg/l kết hợp NAA 0,5, 1 mg/l

Vi khuẩn, môi trường nuôi cấy

Vi khuẩn

Vi khuẩn được sử dụng cho thí nghiệm này là chủng A. tumefaciens EHA 105 chứa plasmid ITB2 mang gen cryIA(c), gen bar và gen gus A.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Sử dụng môi trường LB có bổ sung thêm Kanamycine 100 mg/l và 25mg/l Rifampicine để giữ giống. Để phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen vào thực vật, vi khuẩn được nuôi lắc (250 vòng/phút) 24 giờ trong môi trường AB (Chilton và cộng sự, 1974) cũng chứa các chất kháng sinh nói trên ở nhiệt độ 28oC. Sau 24 giờ nuôi cấy, độ đục đo ở OD600 đạt 0,8.

[1]Trường ĐH Khoa học Tự Nhiên Tp.HCM
[2]Trường ĐH Mở Tp.HCM
[3]Trường ĐH Yersin – Đà Lạt

Điều kiện thí nghiệm

Điều kiện phòng nuôi in vitro:

Nhiệt độ	: 25 ± 2ºC
Quang chu kì	: 10 giờ/ngày
Cường độ chiếu sáng	: 2500± 500 lux
Độ ẩm trung bình	: 70%

Điều kiện ngoài vườn ươm:

Nhiệt độ	: 30 ± 2ºC
Độ ẩm trung bình	: 85%
Ánh sáng tự nhiên	: 3000± 500 lux

2. Phương pháp

Khảo sát khả năng tái sinh của cải xanh từ lá mầm và trụ mầm

Lá mầm và trụ mầm được cô lập từ những cây cải xanh in vitro 7 ngày tuổi. Chúng được cấy vào môi trường tái sinh MS có bổ sung BA, NAA với những nồng độ khác nhau.

Khảo sát tính kháng PPT (Photphinothricin)

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tái sinh của lá mầm và trụ mầm

Các mẫu lá mầm và trụ mầm được cô lập từ cây cải xanh in vitro 7 ngày tuổi, lần lượt cấy vào môi trường tái sinh chồi tốt nhất có bổ sung PPT với các nồng độ: 0, 1, 2, 3, 4 mg/l.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ PPT đến sự sinh trưởng của chồi cải xanh tái sinh từ lá mầm và trụ mầm

Chồi cải xanh tái sinh từ lá mầm và trụ mầm sau 4 tuần được cấy chuyền sang môi trường MS có bổ sung PPT với các nồng độ thay đổi: 0, 2, 3, 4, 5 mg/l.

Khảo sát nồng độ PPT (thuốc trừ cỏ Basta) gây chết cây cải xanh ngoài vườn ươm

Hạt cải xanh được gieo trong các chậu có kích thước 25 x 30 cm, có chứa hỗn hợp đất, tro trấu, phân chuồng với tỉ lệ 1:1:1, mỗi chậu 3 cây. Sau 1 tháng phun thuốc Basta với các nồng độ (0, 50, 100, 150, 200, 250 mg/l).

Chuyển gen vào lá mầm, trụ mầm bằng A. tumefaciens có thấm hút chân không

Giai đoạn 1: Chuẩn bị vật liệu chuyển gen

Các mẫu lá mầm và trụ mầm được đặt trên môi trường tái sinh chồi trong 5 ngày.

Dung dịch vi khuẩn A. tumefaciens đo độ đục OD600 đạt 0,8.

Giai đoạn 2: Nuôi cấy vi khuẩn với lá mầm và trụ mầm

Các lá mầm và trụ mầm được đặt trong đĩa có chứa dung dịch vi khuẩn A. tumefaciens, đặt vào bình hút chân không. Tạo môi trường chân không với áp suất là 200 mmHg và duy trì độ chân không trong khoảng thời gian 10 phút, sau đó cho trở lại áp suất bình thường.

Các mẫu cấy được thấm khô bằng giấy lọc vô trùng và cấy lần lượt lại trên môi trường tái sinh chồi, thời gian nuôi chung 2 ngày.

Giai đoạn 3: Diệt vi khuẩn A. tumefaciens sau khi chuyển gen

Rửa vi khuẩn bám trên các mảnh lá mầm và trụ mầm bằng nước cất vô trùng 3 lần, sau đó ngâm mẫu trong dung dịch Cefotaxime 500 mg/l, lắc nhẹ trong 30 phút. Thấm khô mẫu.

Giai đoạn 4: Đưa vào môi trường chọn lọc

Lá mầm và trụ mầm được thấm khô và cấy lại trên môi trường tái sinh chồi có bổ sung PPT và 500 mg/l Cefotaxime.

Cấy chuyền mẫu trên môi trường mới sau mỗi 2 tuần.

Phương pháp kiểm tra cây chuyển gen

Khả năng tái sinh chồi từ lá mầm và trụ mầm trên môi trường có PPT

Quan sát khả năng tái sinh chồi của các mẫu sau khi chuyển gen trên môi trường có PPT.

Khả năng sinh trưởng của chồi trên môi trường có PPT

Quan sát khả năng phát triển các chồi cải xanh tái sinh sau khi chuyển gen trên môi trường có PPT.

Nhuộm Gus mô tế bào

Xác định khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào tế bào bằng cách kiểm tra biểu hiện tạm thời của gen gus A. Các mẫu lá của cây được nhuộm với thuốc thử X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) ở 37oC. Sau 24 giờ, rửa các mẫu trong cồn tuyệt đối. Mẫu có dấu hiệu biểu hiện gen gus sẽ xuất hiện những đốm màu xanh chàm (Nguyễn Văn Uyển, 1996).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng tái sinh của lá mầm và trụ mầm trên môi trường có các CĐHST

tạo mô sẹo rất tốt (Bùi Trang Việt, 2002). Do đó, khả năng đáp ứng của vật liệu này trên môi trường có các CĐHSTTV rõ rệt; đặc biệt, tại vị trí cắt, chồi tái sinh sớm nhất.

- Chồi tái sinh từ lá mầm (gồm phần cuống lá và phiến lá) như sau: ở phần cuống lá cho khả năng tạo mô sẹo tốt so với phần phiến lá, các chồi đầu tiên được tái sinh ở phần mô sẹo cuống lá. Phần cuống lá (với mô vỏ) có khuynh hướng tạo mô sẹo hơn mô lá (Dương Công Kiên, 2003); phần phiến lá, dưới lớp biểu bì, nhu mô thịt lá sắp xếp rất lỏng lẻo, với nhiều khoảng gian bào rộng thông thương với nhau và liên tục với khí quyển bên ngoài thông qua khí khổng. Nhu mô thịt lá là phần chủ yếu của phiến lá, các tế bào có vách sơ cấp mỏng còn tiềm năng phân chia tế

Bảng 1: Khả năng tái sinh của lá mầm

Môi trường		Tổng số mẫu lá mầm	Số mẫu tạo mô sẹo	Tỷ lệ tái sinh mô sẹo (%)	Số mẫu tái sinh chồi	Tỷ lệ tái sinh chồi sau 6 tuần (%)
BA (mg/l)	*NAA (mg/l)*					
1	1	120	116	96,6 ± 3,2	114	95 ± 3,9
2	1	120	120	100	109	90,8 ± 5,1
2	2	120	111	92,5 ± 4,7	104	86,6 ± 6,1
4	2	120	100	83,3 ± 6,7	85	70,8 ± 8,1

Bảng 2: Khả năng tái sinh của trụ mầm

Môi trường		Tổng số mẫu trụ mầm	Số mẫu tạo mô sẹo	Tỷ lệ tái sinh mô sẹo (%)	Số mẫu tái sinh chồi	Tỷ lệ tái sinh chồi sau 6 tuần (%)
BA (mg/l)	*NAA (mg/l)*					
1	0,5	120	115	95,8 ± 3,5	57	47,5 ± 8,9
2	0,5	120	120	100	77	64,1 ± 8,6
2	1	120	118	98,3 ± 2,3	51	42,5 ± 8,8
4	1	120	120	100	39	32,5 ± 8,4

Kết quả thí nghiệm cho thấy:

- Trụ mầm là nơi chứa các mô phân sinh lóng thân, có nguồn gốc từ mô phân sinh ngọn, xen giữa những vùng mô đã ít nhiều phân hóa. Những tế bào vùng mô này có khả năng tăng trưởng mạnh và

bào; nhờ vậy, các tế bào nhu mô có vai trò hàn gắn vết thương và thường được dùng trong nuôi cấy tế bào in vitro. Các tế bào nhu mô dễ dàng tạo mô sẹo trên môi trường có auxin (Bùi Trang Việt, 2002).

Trong thí nghiệm 1, chúng tôi nhận thấy

sự phát sinh chồi từ lá mầm đạt tỷ lệ cao nhất ở môi trường có bổ sung 1 mg/l BA + 1 mg/l NAA, chồi xuất hiện từ vật liệu trụ mầm nhiều nhất trên môi trường có bổ sung 2 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA.

Khi cô lập mẫu và đặt cấy trên môi trường nhân tạo, mẫu cấy thường xuất hiện etylene, một hormone thực vật giúp sự lão hóa tế bào – một đối kháng của thực vật khi bị vết thương hay sinh lý stress. Việc bổ sung $AgNO_3$ vào môi trường nuôi cấy với mong muốn vai trò cản sự sinh tổng hợp etylen của ion Ag^+, giúp cản đi sự lão hóa của mô cấy trên môi trường nhân tạo (Nguyễn Như Khanh, 2002).

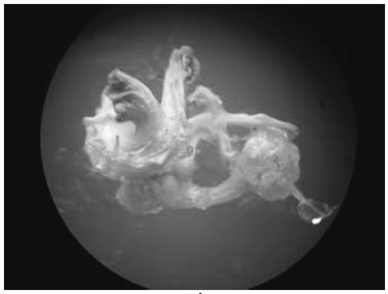
Ở tuần thứ 2, số lá mầm trên môi trường có 2 mg/l PPT bị chết khoảng 87,5%, số lá mầm còn lại vẫn giữ màu xanh nhưng không có khả năng tái sinh so với đối chứng. Các môi trường có nồng độ PPT 3; 4 mg/l mẫu lá chết 100%, lá có màu vàng sậm.

Vậy nồng độ PPT (3 mg/l) được sử dụng để chọn lọc lá mầm sau khi chuyển gen.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tái sinh của trụ mầm

Sau 1 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy trên môi trường có bổ sung PPT 1 mg/l đa số các mẫu trụ mầm vẫn còn xanh so với đối chứng, một số bị vàng, thâm đen. Các nồng độ còn lại, các mẫu trụ mầm đều bị vàng, thâm đen, có dấu hiệu chết dần.

Lá mầm



Trụ mầm

Hình 1: Sự tái sinh chồi của lá mầm và trụ mầm cây cải xanh

Thử nghiệm tính kháng PPT

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tái sinh của lá mầm

Bảng 3: Khả năng tái sinh của lá mầm trên môi trường có PPT

Nghiệm thức	Nồng độ PPT (mg/l)	Tổng số mẫu	Số mẫu chết	Tỷ lệ mẫu chết (%)
Đối chứng	0	120	0	0
1	1	120	55	45,8 ± 8,9
2	2	120	105	87,5 ± 5,9
3	**3**	**120**	**120**	**100**
4	**4**	**120**	**120**	**100**

Sau 1 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy trên môi trường nuôi cấy có bổ sung PPT 1 mg/l và 2 mg/l, các mẫu lá vẫn còn xanh so với đối chứng. Nồng độ 3 mg/l có một số mẫu lá bị mất màu từng phần. Ở nồng độ PPT 4 mg/l, các mẫu lá đều bị vàng, có khuynh hướng chết dần.

Ở tuần thứ 2, số trụ mầm trên môi trường có 1 mg/l PPT bị chết khoảng 81,6 %, số trụ mầm còn lại vẫn giữ màu xanh nhưng không có khả năng tái sinh so với đối chứng. Các môi trường có nồng độ PPT 2; 3; 4 mg/l mẫu lá chết 100%, trụ mầm có màu vàng sậm.

Bảng 4: Khả năng tái sinh của trụ mầm trên môi trường có PPT

Nghiệm thức	**Nồng độ PPT (mg/l)**	**Tổng số mẫu**	**Số mẫu chết**	**Tỷ lệ mẫu chết (%)**
Đối chứng	0	120	0	0
1	1	120	98	81,6 ± 6,9
2	**2**	**120**	**120**	**100**
3	**3**	**120**	**120**	**100**
4	**4**	**120**	**120**	**100**

Vậy nồng độ PPT (2 mg/l) được sử dụng để chọn lọc các trụ mầm sau khi chuyển gen.

Khảo sát nồng độ PPT (thuốc trừ cỏ Basta) gây chết cây cải xanh ngoài vườn ươm

Sau 1 tuần phun thuốc Basta (hoạt chất chính là PPT) ta nhận thấy ở nồng độ 50 mg/l bị mất màu quanh mép lá, màu lá chuyển sang màu xanh đậm, phiến lá lồi lõm. Các cây xử lý ở nồng độ 100, 150, 200, 250 mg/l lá bị cháy vàng, lá co lại, khô héo và cây ngừng phát triển.

Tiếp tục theo dõi tới tuần thứ 2, ở nồng độ 50 mg/l, đa số cây đều có dấu hiệu phục hồi, lá chuyển sang màu xanh, ở ngọn lá non bắt đầu phát triển. Ở nồng độ 100 mg/l, tất cả các lá ngả sang vàng, héo rủ nhưng có hiện tượng phục hồi ở các chồi nách của một số cây. Ở các nồng độ từ 150 mg/l trở lên, tất cả cây cải xanh đều chết khô.

Chúng tôi chọn nồng độ 150 mg/l là nồng độ kiểm tra cây cải xanh chuyển gen 1 tháng tuổi ngoài vườn ươm.

Chuyển gen vào lá mầm và trụ mầm bằng *A. tumefaciens* có thấm hút chân không

Khả năng tái sinh của lá mầm và trụ mầm trên môi trường chọn lọc có PPT

Bảng 5: Khả năng tái sinh của lá mầm trên môi trường chọn lọc PPT

Nghiệm thức	**Tổng số mẫu lá mầm**	**Số mẫu tái sinh chồi**	**Tỷ lệ tái sinh sau 6 tuần (%)**
Đối chứng	30	0	0
Chuyển gen nhờ *A.tumefaciens*	350	1	0,28
Chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* có thấm hút chân không	350	3	0,85

Bảng 6: Khả năng tái sinh của trụ mầm trên môi trường chọn lọc PPT

Nghiệm thức	**Tổng số mẫu trụ mầm**	**Số mẫu tái sinh chồi**	**Tỷ lệ tái sinh sau 6 tuần (%)**
Đối chứng	30	0	0
Chuyển gen nhờ *A.tumefaciens*	350	0	0
Chuyển gen nhờ *A.tumefaciens* có thấm hút chân không	350	2	0,57

Biểu hiện của gen gus sau biến nạp gen

Một số mô sẹo của trụ mầm và chồi của lá mầm cho kết quả dương tính với thuốc thử gus A. Dựa vào kết quả trên, có thể sơ bộ kết luận rằng vi khuẩn *A.tumefaciens* chủng EHA 105 có khả năng chuyển gen từ pITB02 vào mô cải xanh (*B. juncea L.*).

Kết quả thí nghiệm cho thấy:

Lá mầm và trụ mầm cây cải xanh (*B. juncea L.*) có những biên độ chịu đựng thuốc trừ cỏ PPT khác nhau. Những mẫu lá mầm và trụ mầm non, không trải qua quá trình quang tự dưỡng nên có ngưỡng chọn lọc thấp (2 mg/l PPT đối với trụ mầm, 3 mg/l đối với lá mầm).

Nhìn chung, các mẫu lá mầm và trụ mầm non khá nhạy cảm với các điều kiện biến nạp và chọn lọc, nên tỷ lệ sống sau quá trình biến nạp không cao ở cả hai phương pháp chuyển gen: chuyển gen nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens* có thấm hút chân không và chuyển gen nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens* không thấm hút chân không.

Trong quá trình chọn lọc mẫu chuyển gen ở thí nghiệm này, số mẫu lá mầm và trụ mầm sau khi biến nạp gen ở cả hai phương pháp đã hình thành mô sẹo với một tỷ lệ không cao. Một số ít mô sẹo phát sinh thành chồi. Tuy nhiên, sau vài lần cấy chuyền, tất cả các chồi đều không phát triển và có hiện tượng vàng lá, chết. Hiện tượng này tương tự với kết quả chuyển gen ở cây cải thảo *B. campestris* (Zhang và cộng sự, 2000), cải ngọt *B. integrifolia* (Lê Tấn Đức và cộng sự, 2005). Theo Yang và cộng sự (2000), hiện tượng này được coi là escape khá phổ biến trong quá trình chuyển gen, làm cho những chồi không chuyển gen cũng có khả năng phát triển bình thường trên môi trường có chất chọn lọc hoặc chồi ở thể khảm.

Ngoài ra, khi chuyển gen trên các đối tượng cây trồng khác như cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), cây hông (*Paulownia fortunei*) thì mẫu lá có khả năng tái sinh chồi cao từ xung quanh rìa lá ở nhiều vị trí cắt, nên vi khuẩn A. tumefaciens có thể xâm nhập vào nhiều vị trí có khả năng tái sinh này. Trong khi ở lá mầm cải xanh sự tái sinh tại cuống lá và trụ mầm cải xanh thường xảy ra ở 2 đầu mặt cắt, nên vi khuẩn *A.tumefaciens* chỉ có 1 hay 2 vị trí để có thể xâm nhập vào tạo cây chuyển gen. Đồng thời, việc chuyển gen do vi khuẩn *A.tumefaciens* được khởi sự từ vết thương, tế bào thực vật tạo các phenol như acetosyrigon (có nhiều ở các mẫu lá của cây thuốc lá). Do đó các nhà nghiên cứu thường bổ sung lượng acetosyrigon nhằm làm tăng hiệu quả chuyển gen vào cây trồng. Tuy nhiên, trong thí nghiệm này chúng tôi chỉ đơn thuần tìm hiểu tác động của sự lôi cuốn chân không đến các mẫu chuyển gen nên không bổ sung lượng acetosyrigon.

Mặt khác, theo cơ chế chọn lọc của PPT, các đốm nhỏ tế bào đã được biến nạp gen cũng có nguy cơ bị chết trong quá trình chọn lọc do lượng chất độc ammonia tích tụ ở mức cao tại những vùng tế bào không được biến nạp gen xung quanh theo cơ chế khuyếch tán mạnh vào bên trong tế bào đã được chuyển gen và gây chết tế bào. Mặc dù những tế bào biến nạp có thể đã có sự hoạt động của gen bar là gen mã hoá cho enzym phosphinothricin acetyl transferase, phân giải thuốc trừ cỏ PPT thành dạng acetyl, không còn ức chế quá trình sinh tổng hợp glutamin và giải tỏa sự tích tụ amonia (Block và cộng sự, 1997). Do đó, quá trình chuyển gen có xác xuất thành công không cao.

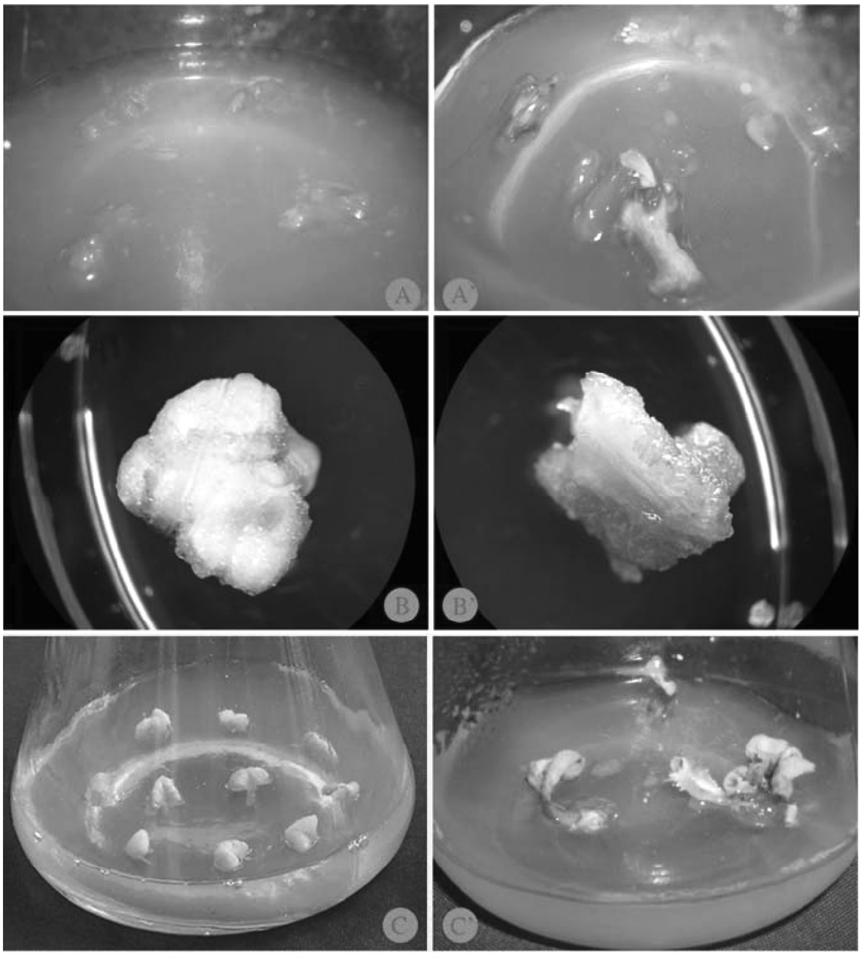
Hiện nay, phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *A.tumefaciens* thông qua thấm hút chân không chỉ mới áp dụng thành công nhiều ở đối tượng *Arapidopsis thailana* (Steve Clough và Andrew Bent, 1998), *Medicago trucatula* (Anthony T. Trieu và cộng sự, 2000). Các tác giả trên đã dùng hệ thống hút chân không phá vỡ các bọt khí ngăn cản sự xâm nhập của vi khuẩn *A.tumefaciens* vào bộ phận hoa của cây, tăng cường tần suất chuyển gen.

Một nghiên cứu đáng ghi nhận ở cây đậu lăng *(Lens culinaris M.)* nhờ vào kỹ thuật thấm hút chân không với dung dịch vi khuẩn *A.tumefaciens* (Mehrzad Mahmoudian và cộng sự, 2002). Cây đậu lăng là loại cây mẫn cảm với dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* (Warkentine và McHughen, 1991; Khawar và Ozcan, 2000). Các báo cáo trước đây cho thấy các nốt lá mầm cây đậu lăng không thể áp dụng chuyển gen gián tiếp nhờ *A.tumefaciens* (Warkentine và McHughen, 1993). Phương pháp chuyển gen thích hợp ở cây đậu lăng là kỹ thuật xung điện (Chowrira và cộng sự, 1995, 1996). Tuy nhiên, Mahmoudian và cộng sự (2000) đã sử dụng hệ thống chân không nhằm làm tăng mật độ tế bào *A.tumefaciens* trong các mô thực vật, tăng cường tần suất chuyển gen ở cây đậu lăng. Tác giả đã thành công khi chuyển gen gus vào nốt lá mầm gián tiếp nhờ *A.tumefaciens* thông qua hệ thống thấm hút chân không.

Các nghiên cứu biến nạp gen cây họ cải *Brassicaceae* đã được thực hiện thành công trên cây cải dầu *B. napus* (Moloney và cộng sự, 1989), cây bắp cải *B. oleracea* (De Block và cộng sự, 1989), cây cải xanh *B. juncea* (Barfield và Pua, 1991), cây cải thảo *B. campestris* (Zhang và Takahata, 2000), cây cải ngọt *B. integrifolia* (Lê Tấn Đức và cộng sự, 2005) thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Tuy nhiên cho đến nay, chúng tôi chưa có thông tin về nghiên cứu biến nạp gen vào mẫu mô cây cải nhờ *A. tumefaciens* thông qua hệ thống thấm hút chân không.

Kết quả bước đầu chuyển gen nhờ hệ thống thấm hút chân không với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens*, chúng tôi đã thu nhận được số mô sẹo và chồi tái sinh có biểu hiện gen *gus A* cao gấp đôi so với phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*, tương tự với kết quả chuyển gen ở nốt lá mầm cây đậu lăng được đề cập trước đó.

Tóm lại, kỹ thuật chuyển gen bằng *A. tumefaciens* thông qua thấm hút chân không là



Hình 2: Sự tái sinh chồi của lá mầm và trụ mầm được chuyển gen trên môi trường chọn lọc

-A, A': Chồi tái sinh từ trụ mầm trên môi trường có PPT – Đối chứng và chuyển gen

-B, B': Nhuộm gus mẫu mô trụ mầm – Đối chứng và chuyển gen

-C, C': Chồi tái sinh từ lá mầm trên môi trường có PPT – Đối chứng và chuyển gen một phương pháp mới, đơn giản, ít tốn kém và khá hiệu quả. Chính vì vậy, các phòng thí nghiệm ở nước ta có thể áp dụng phương pháp này để chuyển gen mang những đặc điểm có lợi vào các cây trồng có tiềm năng kinh tế cao

KẾT LUẬN

Hệ thống tái sinh

- Tái sinh cây cải xanh từ lá mầm cho tỷ lệ tái sinh cao nhất ở môi trường MS + 4 mg/l $AgNO_3$ + 1 mg/l BA + 1 mg/l NAA đạt 95%. Đây là môi trường thích hợp cho việc tái sinh cây cải xanh từ lá mầm.

- Tái sinh cây cải xanh từ trụ mầm cho tỷ lệ tái sinh cao nhất ở môi trường MS + 4 mg/l $AgNO_3$ + 2 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA đạt 64,1%. Đây là môi trường thích hợp cho việc tái sinh cây cải xanh từ trụ mầm.

Thử nghiệm tính kháng PPT

- Nồng độ PPT dùng chọn lọc lá mầm cải xanh chuyển gen là 3 mg/l và trụ mầm cải xanh chuyển gen là 2 mg/l.

- Nồng độ PPT kiểm tra cây cải xanh chuyển gen tái sinh là 4 mg/l.

- Nồng độ PPT (thuốc trừ cỏ Basta) dùng đánh giá cây cải xanh 1 tháng tuổi chuyển gen ngoài vườn ươm là 150 mg/l.

Chuyển gen

- Phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* thông qua thấm hút chân không có số mô sẹo và số chồi tái sinh từ lá mầm, trụ mầm sau khi chuyển gen cao gấp đôi so với phương pháp chuyển gen không thấm hút chân không. Bên cạnh đó chúng cũng có phản ứng dương tính với thuốc thử X-gluc

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] LÊ TẤN ĐỨC, NGUYỄN HỮU HỔ, PHẠM THỊ HẠNH, NGUYỄN VĂN UYỂN, 2005. ***Nghiên cứu tạo cây cải ngọt (Brassica integrifolia) chuyển gen kháng sâu từ trụ mầm thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens.*** Báo cáo hội nghị khoa học toàn quốc, tr. 201 – 204.

[2] NGUYỄN VĂN UYỂN, 1995. ***Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật, tập 1***. NXB Nông Nghiệp, tr. 83 – 96.

[3] NGUYỄN VĂN UYỂN, 1996. ***Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật, tập 2***. NXB Nông Nghiệp, tr. 9 – 22.

[4] CLOUGH S. T., & BENT A. F., 1998. ***Floral dip: a simplified method for Agrobacterium – mediated trasformation of Arabidopsis thaliana.*** Plant J. 16: 735 – 743.

[5] MEHRZAD MAHMOUDIAN, MERAL YUCEL AND HUSEYIN AVNI OKTEM, 2002. ***Transfomation of Lentil (Lens culinaris M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of Agrobacterium tumefaciens.*** Plant Molecular Biology Reports, 20: 251 – 257.