

CHUYỂN GEN *GUS* VÀO ĐỈNH PHÔI HẠT CHÍN GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT12 THÔNG QUA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Đinh Thị Phòng¹, Nguyễn Thị Thu²

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Trung học phổ thông Lê Hồng Phong, Thành Phố Nam Định

TÓM TẮT

Với mục đích nghiên cứu và hoàn thiện phương pháp chuyển gen vào giống đậu tương của Việt Nam thông qua *Agrobacterium tumefaciens*, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu kỹ thuật chuyển vector pPTN289 chứa gen *gus* intron vào giống đậu tương ĐT12 sử dụng hệ thống tái sinh cây thông qua đa chồi tạo từ đỉnh phôi hạt chín. Sau khi khử trùng, các hạt đậu tương được ngâm ngập bằng nước cất vô trùng trong thời gian 24 h. Tách các đỉnh phôi, đặt trên môi trường cảm ứng (MS cơ bản + vitamin B5 + 3,5 mg/l BAP) và nuôi 72 h trong tối. Nhiễm các đỉnh phôi sau cảm ứng với chủng vi khuẩn EHA101 chứa vector pPTN289 ở các thời gian 1,5; 2, 20 và 26 h. Thời gian nhiễm khuẩn cho hiệu quả biến nạp gen *gus* tốt nhất là 2 h với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi là 47% và hiệu quả biểu hiện gen *gus* ở cây tái sinh *in vitro* đạt 12,8%. Tám dòng cây tái sinh *in vitro* (có kí hiệu là T0ĐT12-1, T0ĐT12-2, T0ĐT12-3, T0ĐT12-4, T0ĐT12-5, T0ĐT12-6, T0ĐT12-7, T0ĐT12-8) từ các mẫu sau khi biến nạp gen *gus* đã được trồng ngoài nhà lưới, tại Trại Thực nghiệm sinh học, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội. Các mẫu lá, hoa và thân của 8 cây T0 đều có biểu hiện màu xanh lam đặc trưng của gen *gus plus*. Đã thu được tổng số 330 hạt đậu tương từ 8 dòng T0. Phân tích mức độ biểu hiện của gen *gus* ở các mẫu thân, lá, rễ, hoa ở 10 dòng T1 cho thấy gen *gus* có biểu hiện ở 8 dòng, trong đó, 5 dòng biểu hiện gen *gus* ở lá, 1 dòng biểu hiện *gus* ở cả thân và rễ, 2 dòng biểu hiện ở cả lá và hoa. Như vậy, gen *gus* đã được di truyền từ thể hệ cây T0 sang thể hệ T1.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, đa chồi, đậu tương, gen *gus*, đỉnh phôi hạt chín, tái sinh cây

MỞ ĐẦU

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill] là cây trồng truyền thống, được trồng ở gần 200 nước trên thế giới. Trong đó, diện tích trồng cây đậu tương tập trung chủ yếu ở Hoa Kỳ (34%), Brazil (28%) và Argentina (18%). Ở Việt Nam, cây đậu tương được coi trọng sau lúa và ngô. Tạo giống đậu tương mới có năng suất cao, kháng bệnh, chống chịu khá với các điều kiện bất lợi luôn được các nhà tạo giống quan tâm. Bên cạnh các phương pháp chọn tạo truyền thống, phương pháp chuyển gen đã đem lại hiệu quả cao trong công tác tạo giống đậu tương với các tính trạng mong muốn (Krishnan, 2005; Maerae *et al.*, 2005; Steward, 1996). Theo thống kê của USDA, diện tích trồng cây đậu tương chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ chiếm 81% ở Mỹ, 99,1% ở Argentina và Brazil là 34%; cây đậu tương chuyển gen tăng cường hàm lượng dầu Olic và amino acid đang được thử nghiệm ở Mỹ (Krishnan, 2005). Tuy nhiên ở Việt Nam, tạo giống cây trồng mới bằng công nghệ gen nói chung vẫn đang ở mức độ phòng

thí nghiệm. Các kết quả mới chỉ tập trung chủ yếu trên cây lúa, bông, đu đủ... còn đối với cây đậu tương vẫn ít được tiến hành nghiên cứu.

Trong các kỹ thuật chuyển gen vào thực vật, phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* tỏ ra có nhiều ưu điểm hơn phương pháp dùng súng bắn gen hay vi tiêm (Droste, 2000). Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nguồn vật liệu dùng để nuôi cấy chuyển gen, thời gian cảm ứng, nồng độ vi khuẩn gây nhiễm, khả năng tái sinh của mẫu sau biến nạp...

Để có cơ sở cho nghiên cứu tạo giống đậu tương Việt Nam với tính trạng mong muốn, thì trước tiên phải nghiên cứu và hoàn thiện cho được hệ thống chuyển gen với hiệu quả cao. Công trình này trình bày kết quả “Chuyển gen *gus* vào đỉnh phôi hạt chín giống đậu tương ĐT12 thông qua *Agrobacterium tumefaciens*” để thực hiện việc tạo giống đậu tương mới bằng công nghệ gen ở Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Nguyên liệu**

Hạt chín giống đậu tương ĐT12 do Trung tâm Nghiên cứu phát triển cây đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp được sử dụng làm nguyên liệu chuyển gen. Giống ĐT12 có thể trồng 3 vụ trong năm, phổ thích ứng rộng, được trồng đại trà ở phía Bắc vì có ưu điểm: thời gian sinh trưởng ngắn (70 - 75 ngày), độ thuần khá, năng suất đạt 2 - 2,3 tấn/ha, chống chịu khá với nóng và hạn (Phạm Đồng Quảng *et al.*, 2005)

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA101 mang vector pPTN289 có chứa gen chỉ thị (*gus plus*) và gen kháng thuốc diệt cỏ (gen *bar*).

Tạo nguyên liệu để chuyển gen

Chọn các hạt có kích thước đồng đều, màu vỏ sáng, không nhăn. Hạt đậu tương được khử trùng theo các bước sau: khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% 1 phút; lắc hạt trong dung dịch javen 60% 7 phút và tráng sạch bằng nước cất; ngâm ngập hạt bằng nước vô trùng trong 24 h trong tối ở nhiệt độ 28°C; tách hạt, thu phần đỉnh sinh trưởng của phôi. Cây đỉnh sinh trưởng phôi trên môi trường cảm ứng MS₅ (thành phần như trong bảng 2) và nuôi trong tối 3 ngày. Các mẫu sau khi cảm ứng được lắc trong

dung dịch ½ MS bổ sung 2% siliconcarbide trong 30 phút, sau đó tráng sạch bằng dung dịch ½ MS.

Nuôi cấy tạo khuẩn lạc

Cấy trái *A. tumefaciens* EHA101/ pPTN289 cất giữ trong glycerol lên đĩa môi trường nuôi khuẩn đặc bổ sung 25 mg/l chloramphenicol, 50 mg/l kanamycin, 100 mg/l streptomycin và 100 mg/l spectinomycin. Nuôi vi khuẩn trong tối, ở nhiệt độ 28°C, trong 3 ngày.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn

Chọn một khuẩn lạc trong đĩa khuẩn cho vào 50 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 25 mg/l chloramphenicol, 50 mg/l kanamycin, 100 mg/l streptomycin và 100 mg/l spectinomycin. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 16 h. Dịch khuẩn được ly tâm 6000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cặn vi khuẩn trong ½ MS lỏng bổ sung 100 µM acetosyringone và pha loãng cho tới khi dịch có OD_{660 nm} đạt 0,6 - 1. Dịch huyền phù này có thể dùng biến nạp ngay hoặc giữ ở 4°C trong 1 - 2 h.

Thành phần các môi trường nuôi cấy tạo dịch huyền phù vi khuẩn (môi trường tạo khuẩn lạc, môi trường nuôi lỏng vi khuẩn và môi trường tạo dịch huyền phù vi khuẩn) như trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy tạo dịch huyền phù vi khuẩn.

Môi trường	Thành phần
Nuôi đặc vi khuẩn (LB đặc)	5 g/l yeast extract + 10 g/l NaCl+ 10 g/l tryptone + 15 g/l bactor agar, pH = 7
Nuôi lỏng vi khuẩn (LB lỏng)	5 g/l yeast extract + 10 g/l NaCl+ 10 g/l tryptone, pH = 7
Tạo dịch huyền phù vi khuẩn	½ MS + 100 µM acetosyringone

Ghi chú: * môi trường MS cơ bản của Murashige và Skoog (1962).

Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy

Ngâm mẫu trong dịch huyền phù vi khuẩn với thời gian: 1,5; 2, 20 và 26 h. Chuyển mẫu lên giấy thấm khử trùng và thấm khô. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường tạo cụm chồi (môi trường Mb₄) bổ sung 100 µM acetosyringone (thành phần như trong bảng 2) và nuôi cấy 3 ngày trong tối ở 25°C.

Diệt khuẩn và tạo cụm chồi

Các mẫu sau thời gian đồng nuôi cấy được rửa bằng nước cất vô trùng. Rửa lại mẫu trong nước cất có bổ sung 500 mg/l cefotaxim nhiều lần cho đến khi dịch rửa trong. Thấm khô mẫu trên giấy thấm khử trùng, cấy lên môi trường diệt khuẩn (thành phần như trong bảng 2). Sau 2 tuần, cấy chuyển sang môi

trường mới bổ sung 150 mg/l cefotaxim. Giảm dần nồng độ kháng sinh diệt khuẩn cho đến khi cây ra rễ không bổ sung kháng sinh vào môi trường. Sau 1 tuần, theo dõi số mẫu sống sót và số mẫu tạo cụm chồi trên tổng số mẫu nghiên cứu, số chồi trung bình/cụm ở các thời gian nhiễm khuẩn.

Tái sinh cây hoàn chỉnh

Các chồi có kích thước khoảng 3 cm được chuyển sang môi trường phát triển chồi, các chồi có kích thước 5 - 7 cm được chuyển sang môi trường ra rễ. Cây tái sinh hoàn chỉnh được đưa ra trồng ở nhà lưới.

Phương pháp phân tích biểu hiện gen *gus* bằng nhuộm hoá mô tế bào

Đánh giá sự biểu hiện tạm thời và bền vững của gen *gus* trong các mẫu biến nạp theo phương pháp của Jefferson và đồng tác giả (1987).

Các mẫu lá sau 30 ngày nhiễm khuẩn và các bộ phận (thân, rễ, lá, hoa) của các cây T0 và cây T1 được ngâm ngập trong dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-glucl), để 20 - 30 h trong tối ở nhiệt độ 37°C. Loại bỏ diệp lục bằng cồn 70%, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. Mẫu chuyển gen *gus* sẽ có màu xanh chàm đặc trưng.

Bảng 2. Thành phần môi trường nuôi cấy tái sinh dùng cho chuyển gen qua đỉnh phôi hạt chín.

STT	Môi trường	Thành phần	Ký hiệu
1	Cảm ứng tạo cụm chồi	MS + vitamin B5 + 3,5 mg/l BAP + 20 g/l sucrose + 8,5 g/l agar, pH = 5,8	MSb ₅
2	Tạo cụm chồi	MS + 10 ml/l vitamin B5 + 0,1 mg/l IBA + 0,4 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 8,5 g/l agar, pH = 5,8	Mb ₄
3	Đồng nuôi cây	Mb ₄ + 100 µM acetosyringone	ĐN
4	Diệt khuẩn	Mb ₄ + 250 mg/l cefotaxim	DK
5	Phát triển chồi	1/2 MS + 10 ml/l vitamin B5 + 0,8 mg/l GA3 + 0,05 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 8,5 g/l agar, pH = 5,8	PTC
6	Tạo rễ	1/2 MS + 10 ml/l vitamin 5 + 0,1 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 8,5 g/l agar, pH = 5,8	TR

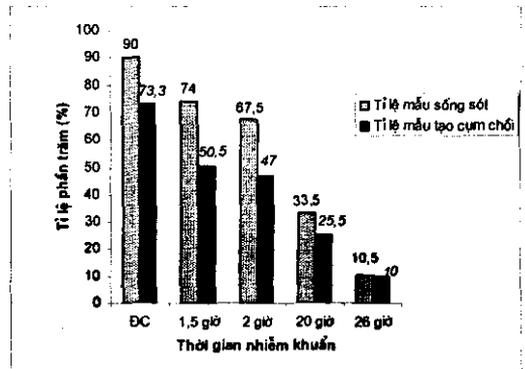
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu suất của quá trình chuyển gen vào đậu tương thông qua *A. tumefaciens* không chỉ phụ thuộc vào hệ thống nuôi cấy mà còn phụ thuộc nhiều yếu tố khác như kiểu di truyền của cây, độ khỏe của mẫu, thời gian cảm ứng, thời gian nhiễm khuẩn, loại vector, nồng độ vi khuẩn, thao tác xử lý mẫu trước khi chuyển gen (Liu *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2004; Droste, 2000). Vì vậy, để đánh giá hiệu quả của kỹ thuật chuyển gen thì thời gian nhiễm khuẩn, khả năng sống sót của mẫu và mức độ biểu hiện của gen *gus* được quan tâm nghiên cứu ở đây.

Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng sống sót của mẫu, khả năng tạo cụm chồi và hiệu quả chuyển gen

Thời gian nhiễm khuẩn là yếu tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn,

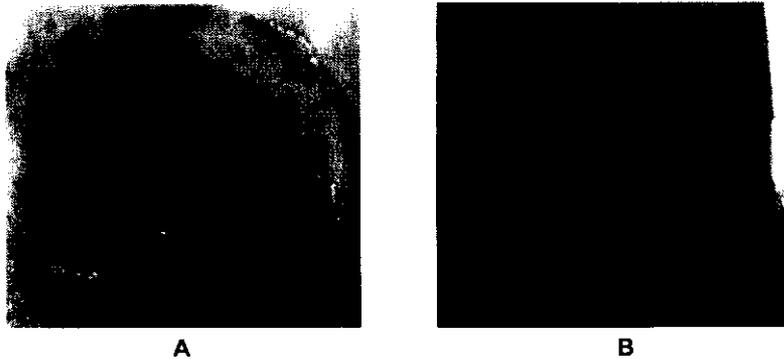
khả năng sống sót cũng như khả năng tái sinh cây (Wei *et al.*, 2000; Strick *et al.*, 1998; Sentairem *et al.*, 1998). Vì thế, tối ưu thời gian nhiễm khuẩn được xem xét trong thí nghiệm này.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng sống sót và tạo cụm chồi của mẫu.

Sau khi cảm ứng 3 ngày, các mẫu được nhiễm với chủng vi khuẩn EHA101 mang vector pPTN289 trong thời gian 1,5; 2, 20 và 26 h. Đánh giá sự sống sót của mẫu sau 1 tuần nhiễm khuẩn. Kết quả ở hình 1 cho thấy thời gian nhiễm khuẩn có ảnh hưởng lớn đến khả năng sống sót của mẫu. Cụ thể, tỷ lệ mẫu sống sót tỷ lệ nghịch với thời gian nhiễm khuẩn, tỷ lệ mẫu sống sót cao nhất đạt 74% với thời gian nhiễm là 1,5 h và tỷ lệ mẫu sống sót thấp nhất là 10,5% với thời gian nhiễm khuẩn là 26 h (Hình 1).

Thêm vào đó, thời gian nhiễm khuẩn cũng ảnh hưởng đến khả năng tạo cụm chồi. Kết quả nhận được ở hình 2 và bảng 3 đã chỉ ra: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi và số chồi trung bình/cụm đạt cao nhất khi nhiễm khuẩn với thời gian 1,5 h (tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi là 50,5% và số chồi trung bình là 2/cụm) và thấp nhất với thời gian nhiễm khuẩn là 26 h (tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi là 10% và số chồi chỉ là 1/cụm). Như vậy rõ ràng thời gian nhiễm khuẩn có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống sót của mẫu cũng như khả năng tạo đa chồi ở giống DT12.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng sống sót của mẫu. A: 26 h; B: 2 h.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng tạo cụm chồi và hiệu quả chuyển gen của giống DT12.

Thời gian nhiễm khuẩn	Số mẫu nhiễm khuẩn	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/cụm	Tỷ lệ mẫu biểu hiện <i>gus plus</i> (%)
ĐC	30	73,3	5 ± 2	0
1,5 h	200	50,5	2,5 ± 2,5	6,4
2 h	200	47	2 ± 2	12,8
20 h	200	25,5	1 ± 1	9,4
26 h	200	10	1 ± 0	5

Các mẫu lá của một số chồi tái sinh từ đỉnh phôi nhiễm khuẩn sau 4 tuần đã được nhuộm với dung dịch X-gluc. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ mẫu có biểu hiện màu xanh lam (biểu hiện của gen *gus*) thấp nhất (đạt 5%) đối với những mẫu có thời gian nhiễm khuẩn là 26 h, và số mẫu có biểu hiện màu xanh lam đạt cao nhất (12,8%) với thời gian nhiễm khuẩn là 2 h.

Quan sát mức độ bắt màu của các mẫu chuyển gen *gus*, chúng tôi cũng nhận thấy màu xanh lam

phân bố khá đồng đều trên toàn bộ diện tích lá (Hình 3). Điều này chứng tỏ vector pPTN289 tương đối thích hợp với giống đậu tương DT12.

Từ kết quả nhận được trên đây, chúng tôi có nhận xét, thời gian nhiễm khuẩn tốt nhất cho các đỉnh phôi hạt chín giống đậu tương DT12 là 2 h. Đây cũng là thời gian cho tỷ lệ mẫu sống sót và tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt cao nhất khi so sánh với các thời gian nhiễm 1,5, 20 và 26 h.

Phân tích sự biểu hiện của gen *gus* trên cây tái sinh trồng trong nhà lưới (T0)

Gen β -glucuronidase (*gus*) được phân lập từ chủng *E. coli* RA201. Gen *gus* mã hóa enzyme β -glucuronidase có khả năng phân huỷ cơ chất glucuronidase thành sản phẩm có khả năng tạo màu xanh lam dễ nhận biết. Nhờ đặc điểm này mà các nhà khoa học đã thiết kế gen *gus* vào các vector chuyển gen để làm chỉ thị dễ nhận biết ở mô, tế bào thực vật mang gen chuyển (Jefferson *et al.*, 1987). Hiện nay, có rất nhiều vector chuyển gen vào thực vật thông dụng được thiết kế có mang gen *gus* như pBI121, pCAM301,... nhưng nhược điểm của các vector này là không được thiết kế đoạn intron ở đầu 5' trước gen *gus*. Vì vậy, khi nhuộm X-gluc, gen *gus* biểu hiện cả ở vi khuẩn và trong cả tế bào thực vật, điều này gây khó khăn cho việc nhận biết chính xác sự có mặt của gen *gus* trong mô tế bào thực vật. Để khắc phục nhược điểm này, vector pPTN289 (của trường Đại học Tổng hợp Nebraska, Mỹ) đã được thiết kế có thêm đoạn intron ở đầu 5' trước gen *gus*, vì thế khi phân tích gen *gus*, màu xanh lam chỉ biểu hiện trong mô và tế bào thực vật mà không biểu hiện trong vi khuẩn khi có mặt của cơ chất X-gluc (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Tám dòng cây tái sinh *in vitro* từ các mẫu sau khi đã biến nạp gen *gus* đã được trồng ngoài nhà lưới, tại Trại Thực nghiệm sinh học, Cỏ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội để đánh giá mức độ biểu hiện của gen *gus*. Kí hiệu các dòng như sau: T0ĐT12-1 đến T0ĐT12-8. Các mẫu lá, hoa và thân của 8 cây đã

được sử dụng để phân tích mức độ biểu hiện của gen *gus plus*. Kết quả cho thấy, tất cả 8 cây T0 giống ĐT12 đều có biểu hiện các vùng xanh lam đặc trưng của gen *gus plus* ở cà thân, lá và hoa (Hình 3). Kết quả này khẳng định gen *gus* đã thực sự có mặt trong genome của cả 8 cây T0 giống ĐT12.

Theo dõi sự phát triển và sinh trưởng của 8 dòng cây ngoài nhà lưới cho thấy tất cả 8 dòng cây đều sinh trưởng và phát triển tương đối bình thường (Hình 3). Đã thu được 330 hạt sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Sự biểu hiện của gen *gus* trên cây đậu tương thế hệ T1

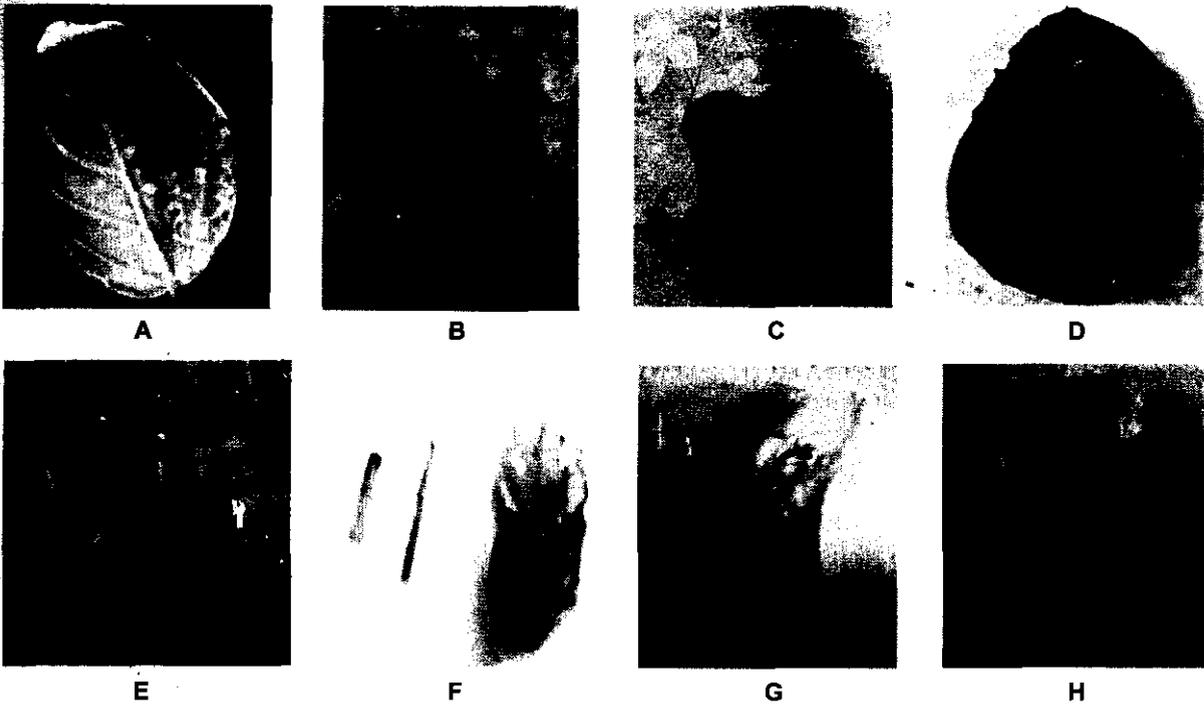
Để đánh giá mức độ biểu hiện của gen *gus* ở thế hệ tiếp theo, chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên 3 hạt của dòng T0ĐT12-2 và 7 hạt của dòng T0ĐT12-3 để phát triển quần thể cây T1. Tất cả các hạt được gieo trong điều kiện *in vitro* hoặc nhà lưới để đánh giá mức độ phân ly của gen *gus*.

Các mẫu lá, thân, rễ và hoa của 10 dòng cây T1 đã được sử dụng cho phân tích gen *gus*. Kết quả cho thấy, 8 trong số 10 dòng có biểu hiện của gen *gus*. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của gen *gus* không giống nhau giữa các dòng. Trong số đó, có 5 dòng biểu hiện *gus* ở lá (dòng T1ĐT12-2-1, T1ĐT12-2-3, T1ĐT12-3-1, T1ĐT12-3-5, T1ĐT12-3-7), 1 dòng biểu hiện *gus* ở thân và rễ (dòng T1ĐT12-3-6), và hai dòng biểu hiện gen *gus* hoa (T1ĐT12-2-2 và T1ĐT12-3-3) (Hình 3 và Bảng 4).

Bảng 4. Biểu hiện gen *gus plus* ở 10 dòng T1 giống ĐT12.

STT	Tên dòng	Mẫu phân tích			
		Lá	Thân	Rễ	Hoa
1	T1ĐT12-2-1	+	x	x	-
2	T1ĐT12-2-2	+	x	x	+
3	T1ĐT12-2-3	+	x	x	-
4	T1ĐT12-3-3	+	-	-	+
5	T1ĐT12-3-1	+	-	-	x
6	T1ĐT12-3-2	-	-	-	x
7	T1ĐT12-3-4	-	-	-	x
8	T1ĐT12-3-5	+	-	-	x
9	T1ĐT12-3-6	-	+	+	x
10	T1ĐT12-3-7	+	-	-	x

Ghi chú: (+): Biểu hiện màu xanh lam của gen *gus*, (-): Không có biểu hiện của màu xanh lam; (x): Không phân tích.



Hình 3. Phân tích biểu hiện gen *gus plus* ở cây *in vitro*, T0 và T1 giống ĐT12. A: Lá cây đối chứng; B lá tách từ cây *in vitro* sau chuyển gen; C: Cây T0 đậu tương ĐT12 chuyển gen *gus* trong bầu đất; D: Lá cây thể thế T0 trồng ngoài đất; E: Cây thể hệ T1; F: đoạn thân và lá cây T1; G: Hoa cây không chuyển gen; H: Hoa cây T1.

Kết quả nhận được cho thấy, rõ ràng gen *gus* đã được di truyền từ cây T0 sang cây T1 qua con đường sinh sản hữu tính và được duy trì trong cây T1.

Với các kết quả thu được ở trên đã khẳng định thành công của việc chuyển gen vào cây đậu tương gián tiếp nhờ *A. tumefaciens* thông qua đa chồi ở giống đậu tương ĐT12. Đây là cơ sở để tạo giống đậu tương có các tính trạng quý.

KẾT LUẬN

1. Đã hoàn thiện được quy trình chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* sử dụng hệ thống tái sinh cây qua đa chồi đối với giống đậu tương ĐT12. Thời gian nhiễm khuẩn cho hiệu quả biến nạp gen *gus* tốt nhất là 2 h, biểu hiện qua tỷ lệ mẫu sống sót là 67,5%, tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi là 47% và hiệu quả biểu hiện gen *gus* ở cây tái sinh *in vitro* đạt 12,8%.

2. Phân tích mức độ biểu hiện của gen *gus* ở 8 dòng cây T0 giống ĐT12 trồng trong chậu (có kí hiệu là T0ĐT12-1, T0ĐT12-2, T0ĐT12-3, T0ĐT12-4, T0ĐT12-5, T0ĐT12-6, T0ĐT12-7, T0ĐT12-8)

cho thấy tất cả 8 dòng cây đều có biểu hiện màu xanh lam đặc trưng của gen *gus plus* ở cả thân, lá và hoa. Đã thu được tổng số 330 hạt đậu tương từ 8 dòng T0.

3. Phân tích mức độ biểu hiện của gen *gus* ở các mẫu thân, lá, rễ, hoa ở 10 dòng T1 cho kết quả có 8/10 dòng có biểu hiện gen *gus*, trong đó 5 dòng biểu hiện gen *gus* ở lá, 1 dòng biểu hiện *gus* ở cả thân và rễ, 2 dòng biểu hiện ở cả lá và hoa. Như vậy gen *gus* đã được di truyền từ thể hệ cây T0 sang thể hệ T1.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài Nghiên cứu cơ bản cấp Nhà nước “Nghiên cứu và hoàn thiện phương pháp chuyển gen vào một số giống đậu tương triển vọng ở Việt Nam thông qua *Agrobacterium tumefaciens*”, mã số: 6 134 06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Droste A (2000) Intergrate bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative

method for soybean transformation. *Plant Mol Biol Rep* 18: 51 - 59.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive ADN versatile gen fusion marker in higher plants. *EMBO J* 16: 3901-3907.

Krishnan HB (2005) Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Sci* 45: 454-461.

Liu HK, Chao Y, Wei ZM (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219: 1042-1049.

Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, Harrison LA, Kabuye VT, Mcpherson RM, Miklos JA, Paradise MS, Toedebusch AS, Viegas A (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. *Jour Econ Entom* 98: 577-587.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Paz MM, Shou H, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* - mediated soybean transformation using the cotyledonary node

explant. *Euphytica* 136: 167-179.

Phạm Đồng Quảng (2005) 575 giống cây trồng nông nghiệp mới, Nhà xuất bản Nông nghiệp: 255.

Santaiem ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17: 752-759.

Stewart CN (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Physiol Plant* 112: 121-129.

Strick HN, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 17: 482-488.

Wei L, Guo G, Zheng G (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect", *Chin Sci Bull Rev* 45(17): 1537-1546.

Vancanneyt G, Schmidt R, Connor-Sanchez AO, Willmitzer L, Sosa MR (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gene Genet* 220: 245-250.

TRANSFORMATION OF GUS GENE INTO SOYBEAN CULTIVAR DT12 USING *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Dinh Thi Phong^{1,*}, Nguyen Thi Thu²

¹Institute of Biotechnology

²Senior high school of Le Hong Phong, Nam Dinh Town

SUMMARY

The purpose of this study is to develop a culture system for *Agrobacterium tumefaciens* mediated-genetic transformation in Vietnamese soybean, vector pPNT289 containing *gus* intron was used to transform into DT12 variety through multi-shoot induction method from maturely zygotic embryo tips. After sterilizing, mature seeds were soaked for 24 h, the embryonic tips were collected and cultured on MS + vitamin B5 + 3.5 mg/l BAP for 72 h in the dark. Induced embryonic tips were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 containing the binary vector pPNT289 for 1.5, 2, 20 and 26 h. Our results showed that the best time for infection was 2 h with efficiency for the *gus* intron gene transformation, multi-shoot numbers reached up to 47% and the *gus* transformation efficiency reached up to 12.8%. Eight of regenerated lines: T0ĐT12-1, T0ĐT12-2, T0ĐT12-3, T0ĐT12-4, T0ĐT12-5, T0ĐT12-6, T0ĐT12-7, T0ĐT12-8 were planted in the greenhouse at the Biological Experimental Station, Conhue, Tuliem, Hanoi. All of leaf, shoot and flower explants from eight T0 lines showed the distinctive blue of *gus* gene. Total 330 seeds were harvested from eight T0 lines. Analysis *gus* gen of

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562368; Fax: 84-4-8363144; E-mail: phongibt@ibt.ac.vn

leaf, shoot and flower explants from ten T1 lines showed that 8/10, which contained *gus* gene, among 5 lines have *gus* gene in leaf, one line has *gus* in shoot and root and 2 lines have *gus* in leaf and flower. So that, *gus* gene was hereditary from generation T0 to generation T1.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *gus* gene, matured embryonic tip, multi-shoot, regeneration, soybean