

THIẾT LẬP QUY TRÌNH TÁI SINH *IN VITRO* VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ CHUYỂN NẠP GEN VÀO CÂY DẦU MÈ (*Jatropha curcas* L.)
THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*
Võ Thị ThúyHuệ¹, Mã Yến Thanh²
² Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM
¹ Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường

GIỚI THIỆU

Cây *Jatropha curcas* được chọn là một trong các phương án nhiên liệu thay thế quan trọng nhất cho con người - nhiên liệu diesel sinh học. Nghiên cứu quy trình tái sinh chồi từ mẫu phôi và lá mầm cây *Jatropha curcas* và đánh giá khả năng thu nạp gen của hai loại mẫu trên khi tiến hành lây nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA101 nhằm tiến đến xây dựng một hệ thống chuyển gen hoàn chỉnh cho cây *Jatropha curcas*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

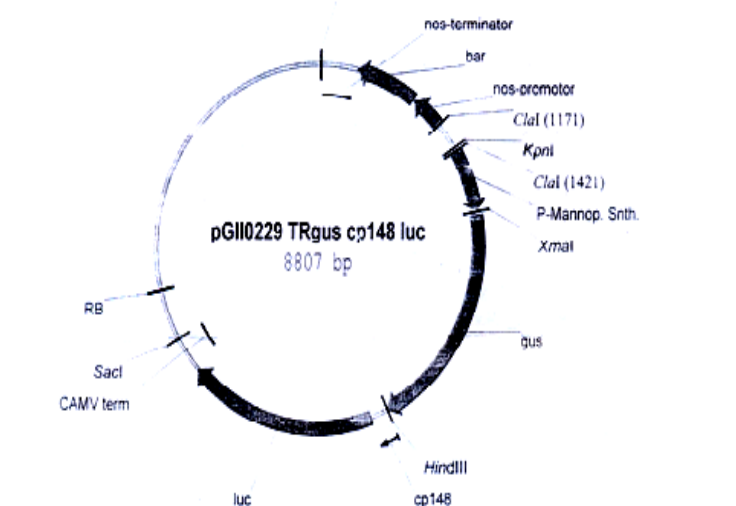
Tái sinh in vitro

Tái sinh chồi từ phôi: môi trường MS bổ sung BA (0; 0,25; 0,5 mg/l) và IBA (0; 0,1; 0,25 mg/l); từ lá mầm: MS bổ sung BA (0; 1,5; 3,0 mg/l) và IBA (0; 0,01; 0,05 mg/l). Sau 5 - 6 tuần nuôi cấy, chuyển cụm chồi tái sinh lên môi trường nhân chồi là MS có bổ sung GA3 (0; 0,1; 0,25; 0,5 mg/l). Tạo rễ: môi trường ½ MS, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar bổ sung 0,5 mg/l IBA.

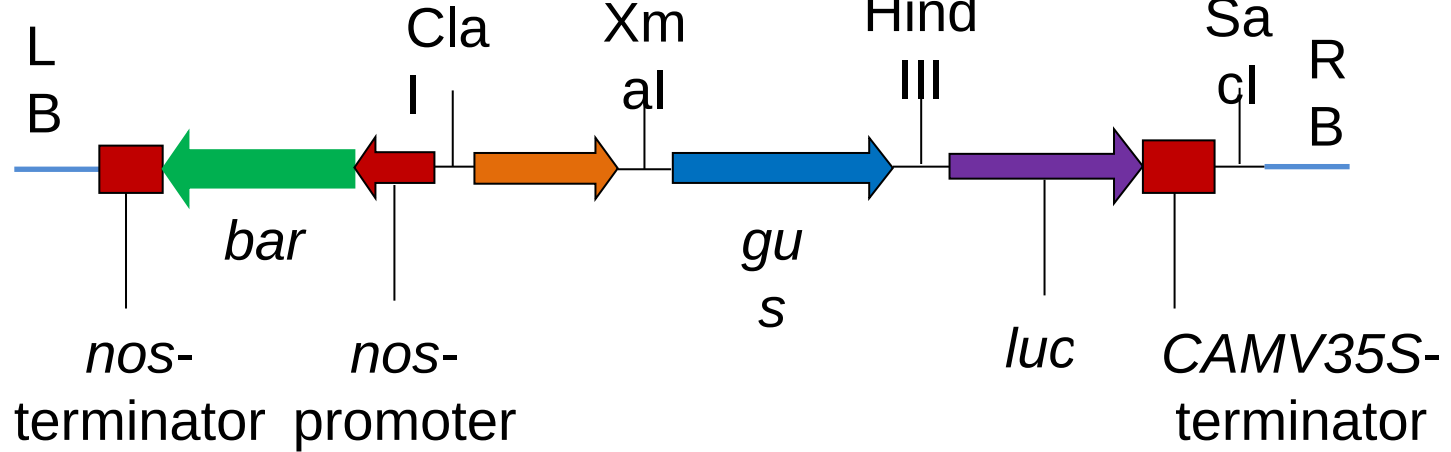
Ảnh hưởng của kanamycin và glufosinate đến sự phát triển của phôi và lá mầm cây *J. curcas* chưa chuyển gen: Glufosinate với các nồng độ 0; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l; kanamycin với các nồng độ 0; 20; 30; 40; 50 mg/l.

Quy trình chuyển gen

Ngâm mẫu vào dung dịch huyền phù vi khuẩn (OD₆₀₀ vào khoảng 0,4 – 0,5) trong 10; 20; 30 phút ở nhiệt độ phòng, bổ sung acetosyringone 100 µM. Thăm khô mẫu bằng giấy lọc rồi chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy. Điều kiện đồng nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, che tối, nuôi cấy trong 2 - 4 ngày. Tiến hành kiểm tra sự biểu hiện Gus các mẫu vừa lây nhiễm với vi khuẩn.



Hình 1: Plasmid pGII0229 Trigus cp148 luc (Jacobsen, 2007)



Hình 2: Sơ đồ vùng T-DNA của plasmid pGII0229 Trigus cp148 luc

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tái sinh in vitro

Kết quả mẫu lá mầm tái sinh chồi tốt nhất trên môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/l kết hợp với IBA 0,05 mg/l, tỉ lệ mẫu tạo chồi đạt 70%, trung bình khoảng 4,72 chồi trên một mẫu (ghi nhận sau 45 ngày nuôi cấy). GA3 nồng độ 0,1 mg/l khi bổ sung vào môi trường tái sinh (môi trường MS + 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l IBA) cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất (8,91 chồi/ mẫu). Rễ hình thành trên môi trường 1/2 MS bổ sung IBA 0,5 mg/l đạt tỉ lệ 75% (sau 3 tuần)



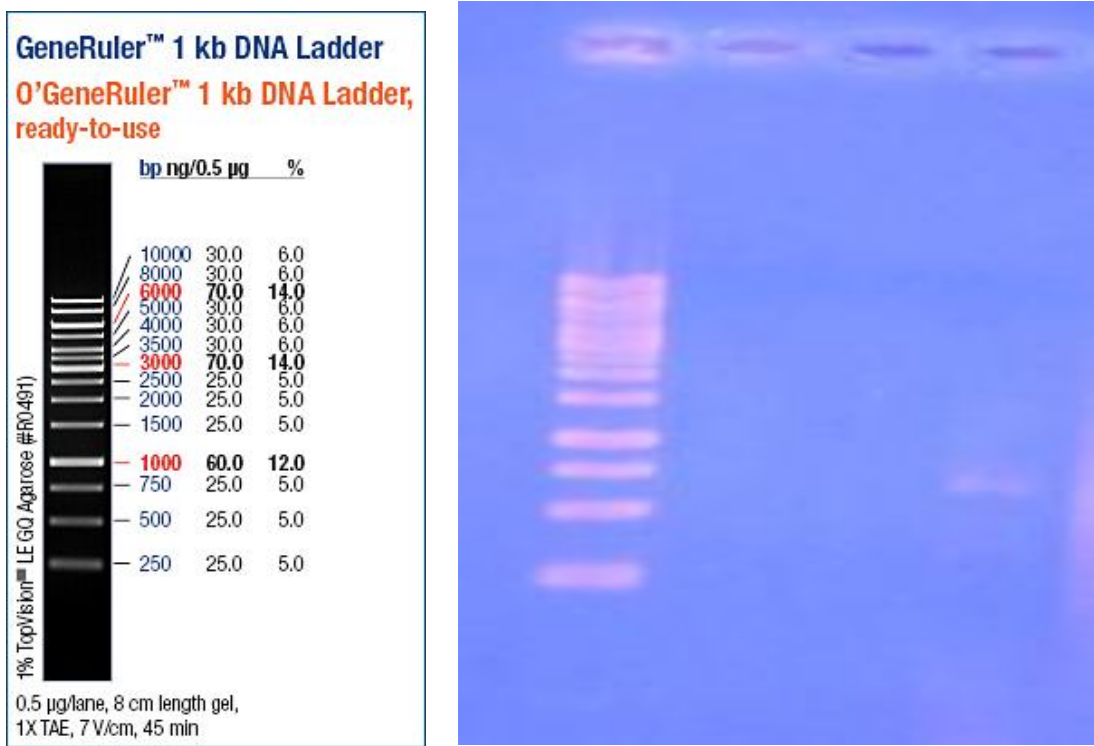
Hình 3: Tái sinh in vitro của cây *Jatropha curcas* L. từ lá mầm

Kiểm tra sự hiện diện của gen bar trên plasmid pGII0229

Các khuẩn lạc sống trên môi trường LB chọn lọc được tách chiết plasmid DNA và kiểm tra một cách chắc chắn sự hiện diện của của plasmid pGII0229 trong vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng phương pháp PCR với cặp mồi gen bar đặc hiệu. Sản phẩm PCR của gen bar khuếch đại với kích thước băng DNA là 748bp.

Bảng 1: Nồng độ plasmid của dòng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Chủng vi khuẩn	Nồng độ plasmid (ng/µl)	Tỉ số A-260/A-280
EHA101pIB-GUS	75,91	1,95

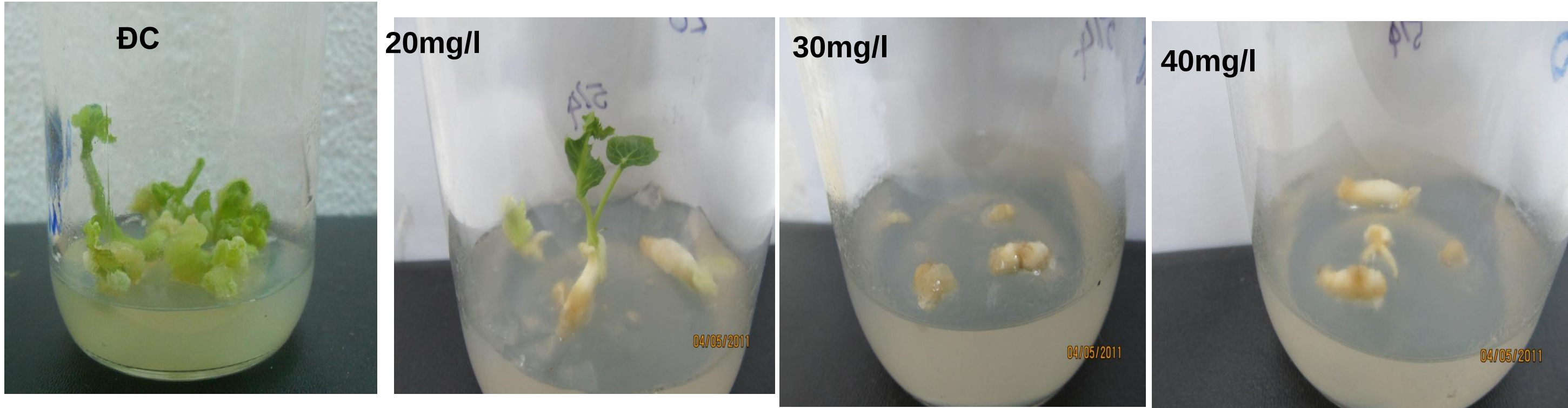


Hình 6: Ladder và kết quả điện di sản phẩm PCR

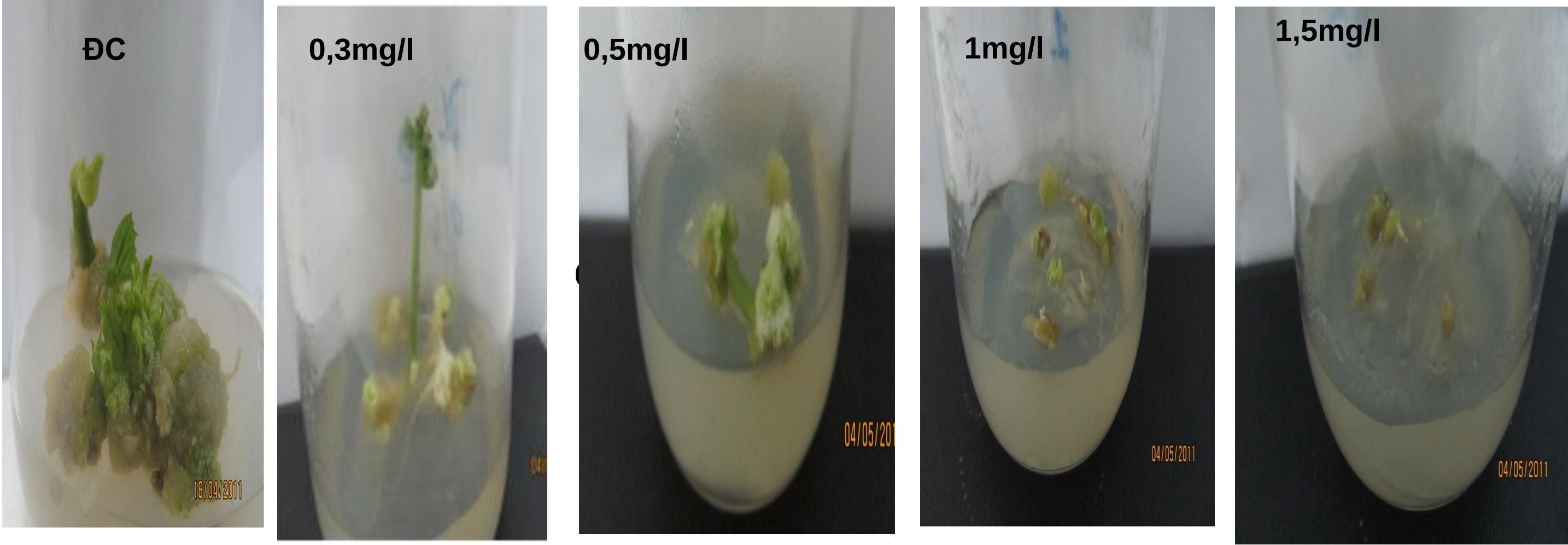
A: Ladder; **B:** kết quả điện di
Giếng 1: thang 1kb (O'Generuler™ 1kb DNA ladder); 2, 3: đối chứng âm; 4: plasmid

Kết quả điện di (hình 6) ta thấy có sự xuất hiện của vạch tương ứng 748bp so với thang chuẩn 1 kb cho thấy có sự hiện diện của gen bar trên plasmid. Kết quả trên khẳng định dòng khuẩn lạc được chọn có mang plasmid pGII0229 chứa gen bar. Do đó có thể sử dụng dòng vi khuẩn này cho các thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.

Ảnh hưởng của kanamycin và glufosinate đến sự phát triển của phôi và lá mầm cây *J. curcas* chưa chuyển gen



Hình 4: Ảnh hưởng của kanamycin lên sự phát triển của phôi chưa chuyển gen



Hình 5: Biểu hiện của phôi cây *Jatropha curcas* chưa chuyển gen do ảnh hưởng của glufosinate

Kết quả biểu hiện Gus

Bảng 2 : Ảnh hưởng của thời gian ủ đến hiệu quả chuyển gen (ghi nhận sau 2 và 4 ngày đồng nuôi cấy)

Thời gian ngâm (phút)	Tỉ lệ biểu hiện gen <i>gusA</i> (%)			
	2 ngày		4 ngày	
	Phôi	Lá mầm	Phôi	Lá mầm
10	0	40	10	60
20	0	40	20	60
30	20	60	40	66,67



Hình 7: Kết quả nhuộm GUS của phôi

Hình 8: Kết quả nhuộm GUS của lá mầm

Mũi tên chỉ các điểm màu xanh chàm do biểu hiện của gen *gus*

Mũi tên chỉ các điểm màu xanh chàm do biểu hiện của gen *gus*

KẾT LUẬN

Lá mầm 15 ngày tuổi thu từ hạt này mầm *in vitro* là vật liệu tái sinh tốt nhất trong môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BA và 0,05 mg/l IBA với 70% số mẫu tái sinh. Môi trường nhân chồi là môi trường MS + 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l IBA bổ sung thêm GA3 0,1 mg/l, đây là môi trường cho số lượng chồi trên một mẫu cấy cao nhất (8,91 chồi). Đối với mẫu phôi, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA và 0,25 mg/l IBA cho hiệu quả tái sinh đạt 20%. Tuy nhiên tỉ lệ tái sinh chồi từ phôi trong môi trường này tương đối thấp, không hiệu quả so với mẫu lá mầm. Các chồi tái sinh *in vitro* được tạo rễ trong môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/l IBA. Hiệu quả tạo rễ trong môi trường này đạt 75%.

Kanamycin nồng độ 30 mg/l được dùng chọn lọc cho cả phôi và lá mầm chuyển gen giả định. Glufosinate nồng độ 1mg/l dùng chọn lọc phôi và nồng độ 1,5 mg/l dùng chọn lọc lá mầm chuyển gen giả định. Đây là các nồng độ kanamycin và glufosinate tối thiểu gây chết 100% mẫu chưa chuyển gen.

Thời gian ủ với dịch vi khuẩn tăng làm hiệu quả chuyển gen tăng. Với thời gian ủ là 30 phút cho hiệu quả biểu hiện gen *gusA* đối với lá mầm là 66,67% , đối với phôi là 40% (sau 4 ngày đồng nuôi cấy).