

Thiết lập quy trình cảm ứng tạo rễ *in vitro* và chuyển gen ở Bạch đàn lai

Nguyễn Thị Huyền^{1,2,3}, Bùi Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Hồng Gấm³,
Lê Sơn², Chu Hoàng Hà^{1,4}, Đỗ Tiến Phát^{1,4*}

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

²Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

³Trường Đại học Lâm nghiệp

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Establishment of a sufficient procedure for *in vitro* hairy root induction and transformation of a Hybrid *Eucalyptus* variety

Nguyen Thi Huyen^{1,2,3}, Bui Phuong Thao¹, Nguyen Thi Hong Gam³,
Le Son², Chu Hoang Ha^{1,4}, Do Tien Phat^{1,4*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology, Vietnamese Academy of Forest Sciences

³Vietnam National University of Forestry

⁴Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

*Corresponding author: dtphat@ibt.ac.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuif.12.4.2023.011-019>

TÓM TẮT

Hiện nay, hệ thống cảm ứng tạo rễ *in vitro* đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu về chức năng cũng như biểu hiện gen và chỉnh sửa hệ gen ở thực vật. Trong nghiên cứu này đã thiết lập được một quy trình hiệu quả cho cảm ứng tạo rễ *in vitro* và chuyển gen ở giống bạch đàn lai UP54 sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes*. Ảnh hưởng của một số yếu tố bao gồm môi trường nền, điều kiện chiếu sáng, chủng vi khuẩn, loại vật liệu, mật độ vi khuẩn, thời gian lây nhiễm và thời gian đồng nuôi cây tới hiệu quả tạo rễ *in vitro* và chuyển gen đã được đánh giá. Kết quả thu được cho thấy, hiệu quả cảm ứng tạo rễ *in vitro* cao nhất được ghi nhận khi các đoạn thân được lây nhiễm với dịch huyền phù của chủng vi khuẩn ATCC 15834 ở mật độ OD_{600nm} là 0,3 trong thời gian 20 phút, đồng nuôi cây trong 3 ngày trước khi chuyển sang môi trường MS với ½ thành phần muối đa lượng và đặt trong điều kiện tối. Tỷ lệ chuyển gen thông qua rễ *in vitro* đạt giá trị cao nhất là 26,67%. Các dòng rễ *in vitro* chuyển gen được kiểm chứng thông qua phương pháp nhuộm X-Gluc và PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *gus* intron và *rolD*. Kết quả này là tiền đề cho việc kiểm tra nhanh chóng hiệu quả hoạt động của cấu trúc chuyển gen và chỉnh sửa gen ở bạch đàn trong các nghiên cứu tiếp theo.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 03/04/2023

Ngày phản biện: 04/05/2023

Ngày quyết định đăng: 19/05/2023

Từ khóa:

Agrobacterium rhizogenes, bạch đàn lai UP, chuyển gen, *gus*, rễ *in vitro*.

ABSTRACT

Currently, hairy root induction systems have been widely applied for studying gene function as well as gene expression and genome editing in plants. In this study, we established an efficient procedure for *in vitro* hairy root induction and transformation of the hybrid eucalyptus variety UP54 using the *Agrobacterium rhizogenes* mediated method. The effect of some factors including basic media, light conditions and bacterial strains, explants, bacterial densities, infection times, and co-cultivation periods on the efficacy of hairy root transformation were assessed in this work. The optimized procedure was conducted in which the stem segments were inoculated with the ATCC 15834 strain at OD_{600nm} 0.3 for 20 minutes, then co-cultivated for 3 days before transferring to the MS ½ macro medium and cultured in the dark. The highest transformation frequency was recorded at 26.67%. The transgenic hairy root lines were confirmed by X-Gluc staining and PCR with specific primers of the *gus* intron and *rolD* genes. This study provides a potential approach for rapidly assessing the activity of transgenic vectors and gene editing constructs in eucalyptus in the future.

Keywords:

Agrobacterium rhizogenes, eucalyptus hybrid UP, *gus*, hairy root, transformation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn (*Eucalyptus*) là một trong các loại cây rừng phổ biến nhất do có khả năng thích nghi cao với nhiều điều kiện khí hậu và nhiều loại lập địa khác nhau. Diện tích trồng bạch đàn ước tính khoảng hơn 20 triệu ha trên toàn thế giới, đặc biệt là ở Trung Quốc, Ấn Độ, Brazil và các nước Đông Nam Á [1]. Ở Việt Nam, bạch đàn là cây lâm nghiệp quan trọng, được trồng rộng rãi tại các tỉnh thuộc vùng Tây Bắc, Đông Bắc, đồng bằng sông Hồng, Bắc Trung Bộ và Tây Nguyên [2].

Hiện nay, việc ứng dụng công nghệ sinh học trong nghiên cứu chọn tạo giống đã mang lại một số thành công đáng kể trên nhiều đối tượng cây lâm nghiệp trong đó có bạch đàn. Các tính trạng được quan tâm bao gồm thay đổi tính chất gỗ, tăng khả năng sinh trưởng, khả năng chống chịu hạn hán, nhiễm mặn, lạnh và chống sâu bệnh hại [3-7]. Đặc biệt, những năm gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 đã được phát triển với tiềm năng to lớn trong quá trình chọn tạo giống cây trồng [8]. Trên đối tượng bạch đàn, công nghệ này đã được triển khai và thu được những thành công bước đầu ở một số loài bạch đàn khác nhau như *E. grandis* [9], *E. grandis* x *E. Urophylla* [10-11]. Nhìn chung, việc phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học vào nghiên cứu cải tạo các giống bạch đàn tại Việt Nam là rất cần thiết, với mục đích gây tạo giống cây trồng mới có năng suất cao, chất lượng tốt góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế ngành lâm nghiệp.

Bước quan trọng hàng đầu quyết định đến sự thành công của phương pháp chuyển gen cũng như chỉnh sửa hệ gen ở thực vật là việc kiểm tra hoạt động của hệ thống vector chuyển gen cũng như cấu trúc chỉnh sửa hệ gen [12]. Bạch đàn là cây trồng lâm nghiệp có hiệu suất chuyển gen rất thấp, cần thời gian dài và chi phí lớn để đánh giá hiệu quả chuyển gen [13]. Do đó, cần một phương pháp nhanh và hiệu quả hơn để đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen ở bạch đàn. Đã có một số công bố gần đây sử dụng thành công hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ để kiểm tra hiệu quả hoạt động của cấu trúc chuyển gen cũng như

chỉnh sửa hệ gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) ở bạch đàn *E. camaldulensis* [14], bạch đàn *E. Grandis* [9], [15-16]. Tuy nhiên, khả năng cảm ứng tạo rễ tơ và hiệu suất chuyển gen thông qua rễ tơ ở các loài bạch đàn được sử dụng là không giống nhau. Hiện tại, chưa ghi nhận nghiên cứu chuyển gen thông qua rễ tơ trên các giống bạch đàn nói chung và bạch đàn lai UP nói riêng tại Việt Nam.

Xuất phát từ các cơ sở trên, việc thiết lập quy trình cảm ứng tạo rễ tơ bạch đàn là bước đầu rất quan trọng trong việc cải thiện và tạo ra các giống bạch đàn mới bằng cách ứng dụng công nghệ sinh học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn bạch đàn lai UP (*E. urophylla* x *E. pellita*) có tính ưu thế lai, sinh trưởng tốt, năng suất cao (đạt từ 25-35 m³/ha/năm) [2] làm đối tượng nghiên cứu với mục tiêu hoàn thiện quy trình chuyển gen tạo rễ tơ và đánh giá hiệu quả chuyển gen trên các dòng rễ tơ. Kết quả thu được sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu về chỉnh sửa hệ gen ở bạch đàn lai trong thời gian tới.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu và hóa chất

Cụm chồi bạch đàn lai dòng UP54 (*E. urophylla* x *E. pellita*) *in vitro* được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và K599 chứa vector pZY102 mang gen chỉ thị *gus intron* được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các cặp mồi đặc hiệu Gus - exon 2-F/R (F-5'-GTAGAAACCCCAACCCGTGA-3' và R-5'-GCTTTTCTTGCCGTTTTCG-3') và 15834 - RoID - qF/R (F-5'-GCTGGGTTGAAGTACCCTCT- 3' và R-5'-TCCCTTAAAGCAGCGAGTGA-3') được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển ở bạch đàn.

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu được trình bày cụ thể ở Bảng 1.

Bảng 1. Môi trường sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy rễ tơ bạch đàn

Môi trường	Thành phần
Nhanh bạch đàn	MS (Murashige and Skoog, 1962) bổ sung 25 g/l sucrose; 0,5 mg/l BAP; 0,25 mg/l NAA; 5 g/l agar; pH 5,8.
Nuôi cấy khuẩn	YMB: 0,65 g/l K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O; 0,2 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g/l NaCl; 0,4 g/l yeast extract; 10 g/l manitol; 15 g/l bacto agar; 100 mg/l spectinomycin, pH 7,0. YEB: 10 g/l peptone; 5 g/l NaCl; 10 g/l yeast extract; 15 g/l bacto agar; 100 mg/l spectinomycin, 100 mg/l streptomycin; pH 7,0.
Lây nhiễm	MS ½ macro (Murashige and Skoog, 1962); 30 g/l sucrose; 100 µM acetosyringone; pH 5,8.
Đồng nuôi cấy (CCM)	MS ½ macro (Murashige and Skoog, 1962); 30 g/l sucrose; 9 g/l agar C; 100 µM acetosyringone; pH 5,8.
Cắm ứng tạo rễ tơ (ICM)	MS ½ macro (Murashige and Skoog, 1962); 30 g/l sucrose; 9 g/l agar C; 200 mg/l cefotaxime; pH 5,8.

Ghi chú: môi trường MS ½ macro là môi trường giảm ½ nồng độ của các nguyên tố đa lượng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp cắm ứng tạo rễ tơ bạch đàn được xây dựng dựa theo nghiên cứu của Plasencia và cộng sự (2016) [16] có cải tiến, cụ thể như sau:

Chuẩn bị nguyên liệu biến nạp: Mẫu bạch đàn lai UP *in vitro* được chọn làm nguyên liệu biến nạp là những chồi có chất lượng đồng đều, sạch bệnh và được nhân trong môi trường nhân nhanh. Cụm chồi sau 3 tuần nuôi cấy được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho quá trình biến nạp.

Chuẩn bị khuẩn: Vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và K599 lưu trữ trong glycerol và bảo quản ở -80°C được cấy vạch trên môi trường YMB/YEB có bổ sung kháng sinh chọn lọc thích hợp và nuôi trong 2-3 ngày ở điều kiện tối với nhiệt độ 28°C để tạo khuẩn lạc. Sử dụng các khuẩn lạc đơn vạch lên môi trường YMB/YEB có bổ sung kháng sinh chọn lọc và nuôi trong điều kiện tối ở nhiệt độ 28°C, sau 2 ngày thu sinh khối khuẩn. Pha loãng trong môi trường lỏng MS ½ macro về mật độ vi khuẩn OD₆₀₀ cần sử dụng cho quá trình biến nạp và bổ sung thêm 100 µM acetosyringone trước khi thực hiện lây nhiễm.

Lây nhiễm: Ba loại vật liệu là mảnh lá, đoạn thân, và đoạn thân chứa mắt ngủ (dài khoảng 0,8 cm) được sử dụng để tiến hành lây nhiễm với 4 mật độ vi khuẩn có giá trị OD_{600nm} lần lượt là 0,1; 0,3; 0,5; 0,7. Vật liệu được ngâm và lắc nhẹ trong huyền phù khuẩn *A. rhizogenes* với 4

khoảng thời gian là 5 phút, 10 phút, 20 phút và 30 phút, sau đó loại bỏ dịch khuẩn và thấm trên giấy thấm vô trùng. Mẫu lây nhiễm được đặt lên môi trường đồng nuôi cấy đã được bao phủ bởi một lớp giấy thấm khử trùng và đồng nuôi cấy trong các khoảng thời gian 1 ngày, 3 ngày hoặc 5 ngày ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện tối.

Cắm ứng tạo rễ tơ: Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu sẽ được rửa bằng nước cất khử trùng có bổ sung 200 mg/l cefotaxime và thấm khô trên giấy thấm tiệt trùng. Chuyển mẫu sang môi trường nuôi cấy tạo rễ tơ bổ sung 200 mg/l cefotaxime và nuôi ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện tối. Theo dõi mẫu tạo rễ tơ sau 21 ngày.

Kiểm tra và đánh giá hiệu quả chuyển gen thông qua nhuộm GUS

Sau 21 ngày nuôi cấy, dung dịch X-Gluc được dùng để kiểm tra biểu hiện của gen chỉ thị *gus* ở các dòng rễ tơ hình thành cho từng thí nghiệm. Mẫu ra rễ tơ được ngâm trong dung dịch nhuộm (0,1% X-Gluc; Tris/NaCl pH 7,2; 10% Triston X-100) và ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó, mẫu được rửa sạch và ngâm trong ethanol 70% để loại bỏ hoàn toàn diệp lục, tiến hành quan sát biểu hiện gen *gus* trên mẫu nhuộm thông qua màu xanh chàm đặc trưng. Tỷ lệ chuyển gen được tính bằng số mẫu bắt màu xanh/tổng số mẫu lây nhiễm x 100%.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

DNA tổng số từ rễ tơ tạo thành được tách chiết theo phương pháp sử dụng

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) của Doyle J (1991) [17]. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng cách khuếch đại các trình tự với các cặp mồi đặc hiệu (Gus - exon 2-F/R và 15834 - RolD - qF/qR) với chu kỳ và chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C trong 3 phút, 30 chu kỳ (94°C trong 20 giây, 57°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây), 72°C trong 7 phút. Sản phẩm khuếch đại PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, nhuộm bằng ethidium bromide và quan sát dưới ánh đèn tia UV.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm trên được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết lập các điều kiện cơ bản trong cảm ứng tạo rễ tơ bạch đàn

Để xây dựng quy trình cảm ứng tạo rễ tơ mang lại hiệu quả chuyển gen cao, đầu tiên tiến hành thiết lập một số điều kiện cơ bản trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ bạch đàn bao gồm môi trường nền, ánh sáng và chủng vi khuẩn lây nhiễm.

Ảnh hưởng của môi trường muối cơ bản đến cảm ứng tạo rễ tơ

Với mỗi loại thực vật và mỗi chủng vi khuẩn khác nhau, môi trường thích hợp để cảm ứng tạo rễ tơ là khác nhau do đặc trưng sinh lý khác nhau của từng chủng vi khuẩn và loại mô [18]. Theo một số công bố trước đây, môi trường cơ bản thường được sử dụng là MS trong cảm ứng tạo rễ tơ ở bạch đàn *E. grandis*, *E. dunnii* và *E. nitens* [19], hoặc MS ½ macro (1/2 muối đa lượng) đối với bạch đàn *E. camal* [14], *E. grandis* [16]. Trong nghiên cứu này, khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của bạch đàn lai UP54 cũng được đánh giá với 2 loại môi trường cơ bản trên.

Kết quả thu được cho thấy, môi trường MS ½ macro cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ đạt 41,86%, cao hơn so với nuôi cấy trên môi trường MS (18,40%) và số rễ trung bình trên mẫu cũng nhiều hơn (1,85 rễ/mẫu) (Bảng 2). Đồng thời, rễ

tơ phát sinh trên môi trường MS ½ macro có màu trắng, nhiều lông hút, khả năng kéo dài và phân nhánh tốt. Kết quả này cao hơn công bố của Balasubramanian và cộng sự (2011) khi cùng sử dụng môi trường MS ½ macro, số lượng rễ tơ trung bình cao nhất đạt 1,3 rễ/mẫu, đồng thời cũng tốt hơn các môi trường MS (0,8 rễ/mẫu), Knop (0,7 rễ/mẫu) và Hoagland (0,6 rễ/mẫu) trong nghiên cứu với bạch đàn *E. camal* [14]. Như vậy, MS ½ macro là môi trường nền thích hợp cho bạch đàn lai UP và sẽ được sử dụng ở các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của ánh sáng đến cảm ứng tạo rễ tơ

Ánh sáng được xem là một trong những nhân tố quan trọng tác động đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ. Tuy nhiên, chế độ chiếu sáng cũng tùy thuộc vào loài thực vật khác nhau, một số loài thì việc nuôi cấy trong tối sau khi rửa khuẩn lại là điều kiện thích hợp để cảm ứng tạo rễ chuyển gen [19].

Trong thí nghiệm này, mẫu bạch đàn UP54 sau khi rửa khuẩn được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ tơ MS ½ macro và nuôi cấy trong 2 điều kiện là tối và sáng. Kết quả thu được cho thấy, trong điều kiện tối, tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao hơn (42,22%) so với trong điều kiện chiếu sáng liên tục (34,44%) sau 21 ngày theo dõi (Bảng 2). Số lượng rễ tơ trung bình trên mẫu khi nuôi trong tối cũng cao hơn với 1,87 rễ/mẫu. Như vậy, nuôi cấy cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện tối là thích hợp và được sử dụng trong thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn đến cảm ứng tạo rễ tơ

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy, mỗi chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* sử dụng để biến nạp có thể ảnh hưởng tới khả năng cảm ứng tạo rễ tơ cũng như hiệu quả chuyển gen trên nhiều loài bạch đàn. Khả năng cảm ứng tạo rễ tơ của chủng *A. rhizogenes* LBA 9402 đạt 80% cho cả 3 giống bạch đàn *E. grandis*, *E. dunnii* và *E. nitens*, cao hơn so với các chủng *A. rhizogenes* R1601, A4R và TR8.3 [19]. Balasubramanian

và cộng sự (2011) nghiên cứu trên bạch đàn *E. camal* sử dụng chủng *A. rhizogenes* A4RS cũng cho kết quả tương tự với báo cáo của Macrae (1994)[14]. Chủng *A. rhizogenes* A4RS còn cho thấy có hiệu quả cao nhất so với hai chủng A4 và Arqual khi lây nhiễm ở bạch đàn *E. grandis* [16].

Trong nghiên cứu này, hai chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 và K599 được sử dụng để đánh giá khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trên bạch

đàn lai UP54. Kết quả thu được ở Bảng 2 cho thấy, chủng K599 không có khả năng cảm ứng tạo rễ tơ trong khi chủng ATCC 15834 gây cảm ứng tạo rễ tơ với tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao (43,33%) với số rễ trung bình trên mẫu là 1,86 rễ/mẫu. Kết quả này cho thấy, chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 phù hợp để sử dụng cho chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ vào dòng bạch đàn lai UP54.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của các điều kiện cơ bản đến cảm ứng tạo rễ tơ

Điều kiện		Số lượng mẫu	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Số rễ TB/mẫu
Môi trường nền	MS	150	18,67 ± 3,06 ^a	1,56 ± 0,14 ^a
	MS ½ macro	150	41,33 ± 1,16 ^b	1,86 ± 0,28 ^a
Điều kiện chiếu sáng	Tối	90	42,22 ± 1,92 ^b	1,87 ± 0,17 ^a
	Sáng	90	34,44 ± 1,93 ^a	1,68 ± 0,12 ^a
Chủng khuẩn	ATCC 15834	90	43,33 ± 3,33	1,86 ± 0,16
	K599	90	0	0

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái a, b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$

Như vậy, khi tiến hành các thí nghiệm khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ bạch đàn *in vitro*, kết quả cho thấy môi trường nền là MS ½ macro, điều kiện nuôi cấy trong tối, sử dụng chủng khuẩn ATCC 15834 là thích hợp nhất để biến nạp trên bạch đàn UP54 với tỷ lệ mẫu tạo được rễ tơ là tốt nhất. Kết quả này một lần nữa cho thấy môi trường, điều kiện nuôi cấy, chủng khuẩn đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng tạo rễ tơ của *A. rhizogenes* trên bạch đàn.

3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen

Nghiên cứu này tập trung vào việc tối ưu các yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chuyển gen bao gồm loại vật liệu, mật độ vi khuẩn, thời gian lây nhiễm và thời gian đồng nuôi cấy.

Ảnh hưởng của loại vật liệu đến hiệu quả chuyển gen

Các vật liệu khác nhau sử dụng trong quá trình biến nạp cho hiệu quả chuyển gen thu được là khác nhau. Trong thí nghiệm này, 3 loại vật liệu gồm đoạn thân, mảnh lá và đoạn thân chứa

mắt ngủ của bạch đàn lai UP *in vitro* 3 tuần tuổi được sử dụng để cảm ứng tạo rễ tơ thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834 (Hình 2A).

Kết quả theo dõi cho thấy, cả 3 loại vật liệu được biến nạp đều phát sinh rễ tơ, tuy nhiên tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cũng như tỷ lệ chuyển gen là khác nhau (Hình 1A). Trong đó, đoạn thân chứa mắt ngủ cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao nhất đạt 49,03% và tỷ lệ chuyển gen cao nhất đạt 34,73%. Đoạn thân không mang mắt ngủ cũng cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ và tỷ lệ chuyển gen cao, lần lượt là 41,34% và 23,31%. Đối với mẫu lá sử dụng biến nạp, hiệu quả chuyển gen thu được thấp hơn hai loại vật liệu còn lại với tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ là 20,39% và tỷ lệ chuyển gen là 13,73%. Bên cạnh đó, khi quan sát mẫu đối chứng không chuyển gen được cấy lên môi trường tương ứng, sau 3 tuần nuôi cấy, mẫu có nguồn gốc từ đoạn thân không có khả năng tạo rễ tơ trong khi đối chứng từ đoạn thân có mắt ngủ xuất hiện rễ và chồi nách cũng phát triển. Nguyên nhân có thể do hàm lượng auxin tích lũy ở đỉnh sinh trưởng của chồi nách, dẫn đến

hiện tượng tạo rễ khi nuôi cấy cảm ứng. Điều này dẫn đến khó khăn khi phân biệt giữa rễ tạo được do chuyển gen và rễ phát sinh từ hiệu ứng chồi nách ở vật liệu đoạn thân chứa mắt ngủ. Như vậy, để thuận lợi cho việc ứng dụng quy trình chuyển gen cho việc kiểm tra hoạt động của cấu trúc sau này, nhận thấy đoạn thân là vật liệu thích hợp nhất.

Ngoài ra, theo nghiên cứu của Plasencia và cộng sự (2016) trên bạch đàn *E. grandis*, hiệu quả chuyển gen thay đổi tùy thuộc vào vật liệu biến nạp và phương pháp lây nhiễm. Thân mầm 14 ngày tuổi lây nhiễm bằng cách đâm kim tiêm có nhúng dịch khuẩn chủng A4RS cho hiệu quả chuyển gen cao nhất, đạt 62% [16]. Đối với vật liệu là đoạn thân *in vitro* và cũng sử dụng phương pháp lây nhiễm đâm kim tiêm vào thân, hiệu quả chuyển gen chỉ đạt 10%. Trong nghiên cứu trên bạch đàn lai UP, sử dụng vật liệu là đoạn thân *in vitro* được cắt 2 đầu và ngâm ngay trong dịch khuẩn cho hiệu quả chuyển gen tốt nhất (> 23%) và cao hơn so với kết quả đã công bố.

Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả chuyển gen

Mật độ vi khuẩn thấp có thể làm giảm tỷ lệ chuyển gen nhưng với mật độ vi khuẩn quá cao thì sẽ làm tổn thương đến mẫu, gây ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng tạo rễ tơ và dễ bị nhiễm khuẩn lại ở giai đoạn nuôi cấy. Để xác định mật độ vi khuẩn thích hợp cho quá trình cảm ứng tạo rễ tơ, đoạn thân được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn ở giá trị OD_{600nm} lần lượt là 0,1; 0,3; 0,5 và 0,7.

Sau 21 ngày nuôi cấy cảm ứng, rễ tơ tạo ra được thu thập để tiến hành nhuộm GUS và xác định tỷ lệ chuyển gen. Kết quả cho thấy, đoạn thân được lây nhiễm ở OD_{600nm} đạt 0,3 cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cao nhất là 50% và tỷ lệ chuyển gen cao nhất đạt 24,67% (Hình 1B). Khi OD_{600nm} lên đến 0,5 - 0,7 thì tỷ lệ mẫu hình thành rễ tơ cũng như tỷ lệ chuyển gen có xu hướng giảm dần và quan sát thấy có hiện tượng phát triển quá mức của vi khuẩn khi đồng nuôi

cây gây ra mẫu bị thâm đen và chết khi nuôi cấy phát sinh rễ tơ. Kết quả này cho thấy mật độ vi khuẩn thích hợp để biến nạp ở bạch đàn lai *in vitro* là 0,3.

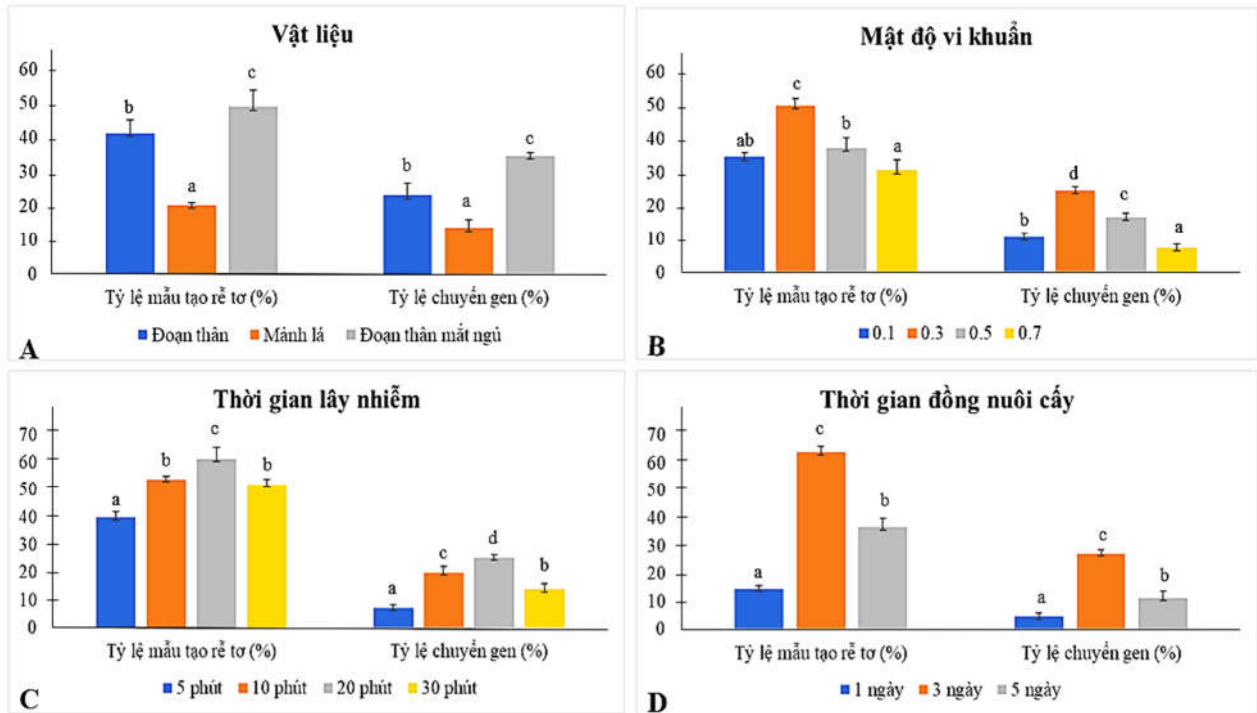
Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen

Thời gian lây nhiễm là thời gian cần thiết để vi khuẩn có thể tiếp xúc với tế bào thực vật tại vị trí bị tổn thương. Thời gian lây nhiễm ngắn sẽ làm giảm khả năng vi khuẩn xâm nhập vào tế bào thực vật và thời gian lây nhiễm kéo dài có thể gây ảnh hưởng làm tổn thương đến mẫu. Sử dụng mật độ vi khuẩn đã được tối ưu để biến nạp, chúng tôi xác định thời gian lây nhiễm thích hợp nhất bằng cách ngâm đoạn thân trong dịch khuẩn ở các thời gian 5, 10, 20 và 30 phút.

Kết quả thu được cho thấy, thời gian lây nhiễm 20 phút cho tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ và tỷ lệ chuyển gen là cao nhất lần lượt là 61,33% và 25,33%. Khi thời gian lây nhiễm ngắn hơn (5, 10 phút) hoặc lâu hơn (30 phút) thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cũng như tỷ lệ chuyển gen bị giảm đi (Hình 1C). Ngoài ra, thời gian lây nhiễm kéo dài 30 phút còn gây ra hiện tượng mẫu chết do sự phát triển quá mức của vi khuẩn và gây ra nhiễm khuẩn lại khi nuôi cấy. Như vậy, thời gian lây nhiễm thích hợp cho bạch đàn lai UP54 là 20 phút.

Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen

Thời gian đồng nuôi cấy là giai đoạn cần thiết trong phương pháp lây nhiễm trực tiếp với *A. rhizogenes* lên mô tế bào chủ [20]. Để tối ưu hóa thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho chuyển gen vào đoạn thân bạch đàn lai UP54 bằng chủng ATCC 15834, ba khoảng thời gian được nghiên cứu là 1, 3 và 5 ngày. Hình 1D chỉ ra rằng, thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày là thích hợp nhất với tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (64,0%) và tỷ lệ chuyển gen (27,33%) thu được là cao nhất. Khi thời gian đồng nuôi cấy kéo dài đến 5 ngày không những làm giảm tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ cũng như tỷ lệ chuyển gen mà mẫu còn có hiện tượng thâm đen và chết hay bị nhiễm khuẩn lại do sự phát triển quá mức của vi khuẩn.



Hình 1. Kết quả tối ưu các điều kiện ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ ở bạch đàn lai UP

(A) Loại vật liệu; (B) Mật độ vi khuẩn; (C) Thời gian lây nhiễm; (D) Thời gian đồng nuôi cấy
 Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$

3.3. Đánh giá hiệu quả của quy trình cảm ứng tạo rễ tơ phục vụ nghiên cứu chuyển gen đã được tối ưu

Tổng hợp các kết quả trên cho thấy đã tối ưu được các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* thông qua vi

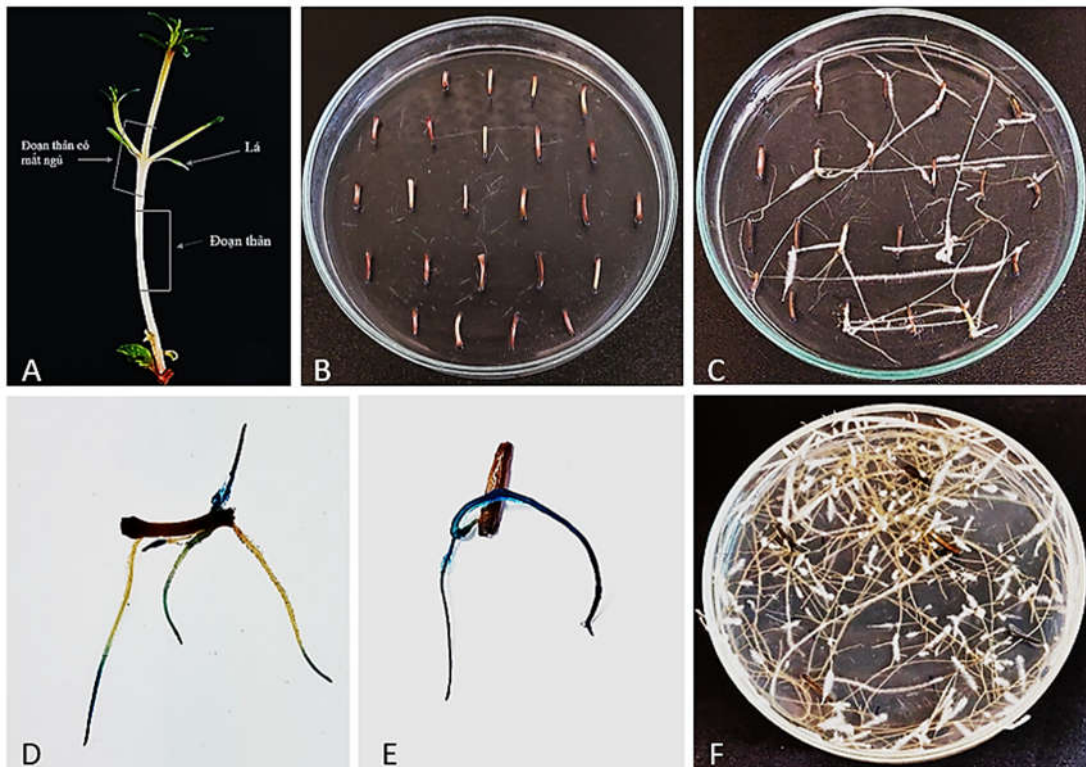
khuẩn *A. rhizogenes* ở bạch đàn lai UP với các yếu tố được tối ưu gồm vật liệu (đoạn thân), mật độ vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,3$), thời gian lây nhiễm (20 phút) và thời gian đồng nuôi cấy (3 ngày) (Hình 2).

Bảng 3. Kết quả đánh giá quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* ở bạch đàn lai UP với các điều kiện tối ưu đã được thiết lập

Lô TN	Số lượng mẫu	Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ (%)	Số rễ TB/mẫu	Tỷ lệ chuyển gen (%)
1	100	65,00	2,23	27,00
2	100	62,00	2,36	26,00
3	100	64,00	2,34	27,00
Trung bình		$63,67 \pm 1,53$	$2,32 \pm 0,04$	$26,67 \pm 0,58$

Khi thực hiện quy trình với số lượng mẫu lớn thì tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ đạt 63,67% và tỷ lệ mẫu chuyển gen đạt tới 26,67% (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu này cho thấy dòng UP54 có khả năng tiếp nhận cấu trúc chuyển gen pZY102/*gus*

trong điều kiện phòng thí nghiệm khi kết hợp các điều kiện tối ưu với nhau và thực hiện trên số lượng mẫu lớn với khả năng tạo rễ tơ cũng như hiệu quả chuyển gen là tương đối ổn định và có tính lặp lại cao.

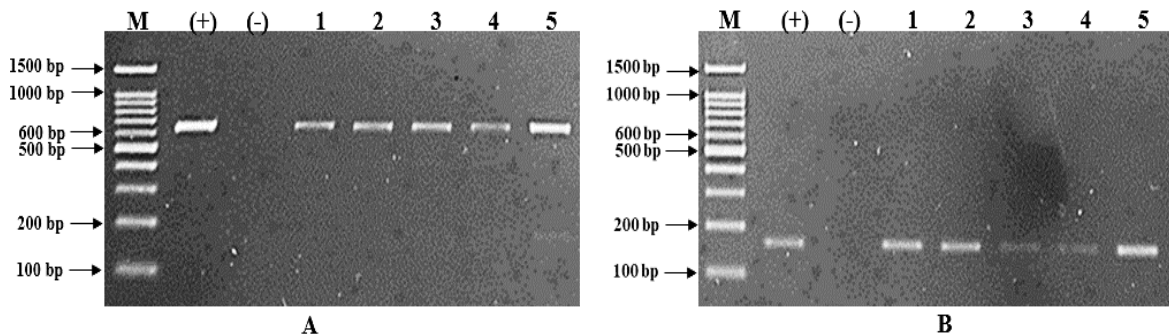


Hình 2. Các bước trong quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* trên bạch đàn lai UP thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC

(A) Mẫu bạch đàn UP *in vitro*, (B) Mẫu sau biến nạp nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo rễ tơ, (C) Rễ tơ hình thành trên môi trường cảm ứng sau 21 ngày nuôi cấy, (D, E) Kết quả nhuộm X-Gluc và (F) Rễ tơ phát triển trên môi trường MS 1/2 macro sau 90 ngày

Bên cạnh đó, các dòng rễ tơ bắt màu xanh khi nhuộm với X-Gluc cũng được kiểm tra bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen chuyển là *gus* và *rolD*. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy ở các giếng chứa mẫu là các rễ tơ dương tính với nhuộm X-Gluc đều xuất hiện băng vạch có kích thước lần lượt là 650 bp và 170 bp, tương ứng với băng

vạch ở giếng đối chứng dương và là kích thước theo tính toán lý thuyết của gen *gus* và *rolD* (Hình 3). Như vậy, kết quả PCR một lần nữa khẳng định các dòng rễ thu được là các dòng rễ tơ tạo được từ quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834. Các dòng rễ này được nhân và lưu giữ để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo trong thời gian tới.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen chuyển ở bạch đàn lai UP

(A) Xác nhận sự hiện diện của gen *gus*; (B) Xác nhận sự hiện diện của gen *rolD*

M: Marker, (+): đối chứng dương (plasmid), (-): đối chứng âm, 1-5: các dòng rễ tơ nhuộm GUS xanh.

4. KẾT LUẬN

Quy trình chuyển gen cảm ứng tạo rễ *in vitro* ở bạch đàn lai UP thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* đã được thiết lập thành công. Vật liệu thích hợp nhất là đoạn thân *in vitro* được sử dụng để lây nhiễm với chủng *A. rhizogenes* ATCC 15834 có OD_{600nm} là 0,3 trong thời gian 20 phút và đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối. Mẫu sau biến nạp được nuôi cấy trên môi trường nền MS ½ macro trong điều kiện tối cho hiệu quả chuyển gen đạt 26,67%. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở cho việc kiểm tra hiệu quả hoạt động của cấu trúc chuyển gen phục vụ cho nghiên cứu nâng cao chất lượng các giống bạch đàn thông qua chuyển gen và chỉnh sửa hệ gen trong thời gian tới.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí đề tài “Hỗ trợ hoạt động nghiên cứu khoa học cho nghiên cứu viên cao cấp năm 2022-2023”, mã số NCVCC08.01/22-23.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. G. Forestry (2009). Global Eucalyptus Map. <http://www.git-forestry.com>.

[2]. Lê Đình Khả, Hà Huy Thịnh & Nguyễn Việt Cường (2005). Cải thiện giống Bạch đàn cho các chương trình trồng rừng ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 20 năm đổi mới. 5: 167-178.

[3]. V. Lauvergeat, P. Rech, A. Jauneau, C. Guez, P. Coutos-Thevenot & J. Grima-Pettenati (2002). The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase *EgCAD2* promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. Plant Mol Biol. 50(3): 497-509.

[4]. C. K. Ho, Y. C. Chen & Z. Z. Chen (2002). cDNA cloning and sequence analysis of 5-hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase from *Eucalyptus camaldulensis*. Taiwan Journal of Forest Science. 17: 429-438.

[5]. M. Ranik & A. A. Myburg (2006). Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. Tree Physiol. 26(5): 545-556.

[6]. Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hồng Gám, Nguyễn Thị Huyền & Chu Hoàng Hà (2017). Tạo cây Bạch đàn Urô chuyển gen *GS1* mã hóa glutamine synthetase tăng cường hiệu quả sử dụng nitrogen. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT. 9.

[7]. Z. Z. Chen, S. H. Chang, C. K. Ho, Y. C. Chen, J. B. Tsai & V. L. Chiang (2001). Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4 - hydroxylase gene. Plant Biotechnology Journal. 16(4): 249-258.

[8]. A. M. Korotkova, S. V. Gerasimova & E. K. Khlestkina (2019). Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. Vavilov journal of genetics and breeding. 23(1): 29-37.

[9]. Y. Dai, G. Hu, A. Dupas, L. Medina, N. Blandels, H. San Clemente, N. Ladouce, M. Badawi, G. Hernandez-Raquet, F. Mounet, J. Grima-Pettenati & H. Cassan-Wang (2020). Implementing the CRISPR/Cas9 Technology in Eucalyptus Hairy Roots Using Wood-Related Genes. International Journal of Molecular Sciences. 21(10): 3387-3408.

[10]. E. Elorriaga, A. L. Klocko, C. Ma, M. Plessis, X. An, A. A. Myburg & S. H. Strauss (2021). Genetic containment in vegetatively propagated forest trees: CRISPR disruption of LEAFY function in *Eucalyptus* gives sterile indeterminate inflorescences and normal juvenile development. Plant Biotechnology Journal 19(9): 1743-1755.

[11]. Z. Wang, L. Li & L. Ouyang (2021). Efficient genetic transformation method for *Eucalyptus* genome editing. Plos one. 16(5):1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252011>

[12]. S. B. Gelvin (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. Microbiology and molecular biology reviews. 67(1): 16-37.

[13]. V. Girijashankar (2011). Genetic transformation of *Eucalyptus*. Physiology and Molecular Biology of Plants. 17: 9-23.

[14]. A. Balasubramanian, R. Venkatachalam, K. R. Selvakesavan, A. S. Mary, H. Gherb, S. Svistoonoff, C. Franche, D. Bogusz, N. K. Kumar & N. Nambiar-Veetil (2011). Optimisation of methods for Agrobacterium rhizogenes mediated generation of composite plants in *Eucalyptus camaldulensis*. BMC Proceedings. 5(7): 1-3.

[15]. K. L. Plett, A. E. Raposo, S. Bullivant, I. C. Anderson, S. C. Piller & J. M. Plett (2017). Root morphogenic pathways in *Eucalyptus grandis* are modified by the activity of protein arginine methyltransferases. BMC Plant Biology 17. 62: 1-16.

[16]. A. Plasencia, M. Soler, A. Dupas, N. Ladouce, G. Silva-Martins, Y. Martinez, C. Lapierre, C. Franche, I. Truchet & J. Grima-Pettenati (2016). *Eucalyptus* hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. Plant Biotechnol Journal. 14(6): 1381-1393.

[17]. J. Doyle (1991). DNA protocols for plants. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPCW (eds) Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). Springer, Berlin, Heidelberg. 283-293

[18]. Y. O. Çiftçi (2012). Transgenic Plants: Advances and Limitations. InTech.

[19]. S. MacRae (1994). "The use of Agrobacterium for plant improvement", Doctor of Philosophy, University of Natal, Pietermaritzburg, University of Natal, Pietermaritzburg.

[20]. K. Wang (2006). Agrobacterium protocols Totowa, New Jersey: Humana Press. 474.