

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN *CodA* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

Ngô Mạnh Dũng¹, Tạ Thị Đông², Phạm Bích Ngọc²,
Chu Hoàng Hà², Chu Hoàng Mậu^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên,

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

TÓM TẮT

Đậu tương là loại cây trồng nhạy cảm với các stress phi sinh học và được coi là cây chống chịu kém với các yếu tố bất lợi từ môi trường. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen để nâng cao khả năng chống chịu các stress phi sinh học ở đậu tương đang được quan tâm nghiên cứu. Hiệu quả chuyển gen ở đậu tương không những phụ thuộc vào kiểu gen của giống mà còn chịu ảnh hưởng của các yếu tố như thao tác gây tổn thương, nồng độ vi khuẩn, chất chọn lọc, chất kích thích sinh trưởng... Trong nghiên cứu này, một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen *CodA* vào giống đậu tương ĐT22 đã được khảo sát. Kết quả cho thấy sử dụng phosphinothricin (ppt) 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và ppt 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ = 0,6 với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.

Từ khóa: *CodA*; giống đậu tương ĐT22; hiệu quả chuyển gen; nhân tố ảnh hưởng; phosphinothricin

Ngày nhận bài: 25/9/2020; Ngày hoàn thiện: 23/10/2020; Ngày đăng: 31/10/2020

THE INFLUENCE OF SOME FACTORS ON THE EFFICIENCY OF *CodA* GENE TRANSFORMATION INTO THE DT22 SOYBEAN VARIETY

Ngo Manh Dung¹, Ta Thi Dong², Pham Bich Ngoc²,
Chu Hoang Ha², Chu Hoang Mau^{1*}

¹TNU- University of Education,

²Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

Soybean is a sensitive crop to abiotic stresses and is considered a poor tolerant plant to the adverse environmental factors. The application of gene transfer to improve tolerance to abiotic stresses in soybeans is being researched concerned. The efficiency of genetic transformation in soybeans not only depends on the genotype of each variety but is also influenced by factors such as damage manipulation, bacterial concentration, selective substances, growth stimulants... In this study, some factors affecting the efficiency of *CodA* gene transfer into the soybean variety DT22 were investigated. The results showed that using 3.0 mg/l phosphinothricin (ppt) in the SIM medium at the shoot induction phase and 1.5 mg/l ppt in the SEM medium at the shoot elongation phase gave the highest selective efficiency. Bacterial solution with OD₆₅₀ = 0.6 with an incubation time of 30 minutes, co-culture for 3 days in the dark, and bactericidal with cefotaxime 500 mg/l is suitable for shoot induction and shoot elongation on selective medium.

Keywords: *CodA*; soybean variety DT22; efficiency of gene transfer; influencing factors; phosphinothricin

Received: 25/9/2020; Revised: 23/10/2020; Published: 31/10/2020

* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Đậu tương là loại cây trồng nhạy cảm với các stress phi sinh học và được xếp vào nhóm cây chống chịu kém các yếu tố bất lợi của môi trường, do vậy việc tăng cường khả năng chống chịu các stress của cây đậu tương trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay là vấn đề rất được quan tâm. Công nghệ gen đã mở ra một giai đoạn mới trong lĩnh vực phát triển nông nghiệp, cho phép tạo ra các cây trồng chuyển gen mang đặc tính mới, có định hướng và rút ngắn thời gian chọn tạo giống.

Biến đổi khí hậu gây ra những tác động bất lợi như khô hạn, nhiễm mặn, nhiệt độ cực đoan và thường làm mất cân bằng về áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của nhiều loại cây trồng. Trong điều kiện khô hạn, mặn, lạnh, thực vật có xu hướng tăng cường tổng hợp, tích lũy các chất chuyển hoá như các loại đường tan, amino acid để tăng cường áp suất thẩm thấu cho tế bào. Gần đây, một số nghiên cứu cho thấy glycine betaine là chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện bất lợi. Một số cây trồng chuyển gen mã hoá cho các enzyme liên quan đến con đường sinh tổng hợp glycine betaine cho thấy khả năng chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường như lạnh, nóng, hạn và mặn [1]-[4]. Trong số đó, gen *CodA* được phân lập từ vi khuẩn *A. globiformis*, mã hóa sinh tổng hợp enzyme choline oxidase (COD) được biết đến như một gen tiềm năng trong việc tạo ra cây chuyển gen có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh [1], [3]. Hiện nay, nhiều quy trình chuyển gen đã được áp dụng đối với cây đậu tương, nhưng phổ biến là biến nạp gen bằng lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn một số hạn chế cần được khắc phục như thao tác tạo tổn thương cần có độ chính xác cao, nồng độ vi khuẩn sử dụng cho biến nạp cần tối ưu theo từng chủng, nồng độ chất chọn lọc sử dụng cho chọn lọc cây chuyển gen. Ngoài ra, hiệu quả chuyển gen còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống đậu tương và đến nay

ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu chuyển gen vào các giống đậu tương DT84, DT2008 trong mục đích làm tăng tích lũy proline và isoflavone và hiệu suất chuyển gen khác nhau giữa các giống [5], [6]. Chính vì vậy nghiên cứu chọn điều kiện chuyển gen thích hợp với kiểu gen của mỗi giống được chú ý và quan tâm bởi các nhà nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của phosphinothricin, nồng độ và thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens*, đồng nuôi cấy, nồng độ kháng sinh chọn lọc đến hiệu quả chuyển gen *CodA* vào giống đậu tương DT22 của Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Hạt giống đậu tương DT22 được cung cấp từ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Chủng khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2206 (IPK, Gatersleben, Đức) mang vector pIBTII/*rd29A-CodA* sử dụng để biến nạp (Hình 1). Môi trường cơ bản MS [7] bổ sung vitamin B5. Các chất điều hòa sinh trưởng: Benzyl amino purine (BAP), Indol - 3 - butyric acid (IBA)...; kháng sinh: Spectinomycine, rifamicine, cefotaxim...; các hóa chất khác như: Yeast extract, bacto pepton, trypton, NaCl, agarose, sucrose, glycerol, DDT, L- Cystein, Na₂S₂O₃, phosphinothricin được cung cấp bởi các hãng: New England Biolabs (Anh), Amersham Pharmacia Biotech (Thụy Điển), Chemicals (Đức), Sigma (Mỹ), Duchefa (Hà Lan), Merck (Đức) và Wako (Nhật Bản). Thành phần môi trường sử dụng trong chuyển gen vào giống đậu tương DT22 được thể hiện ở bảng 1.

2.2. Phương pháp

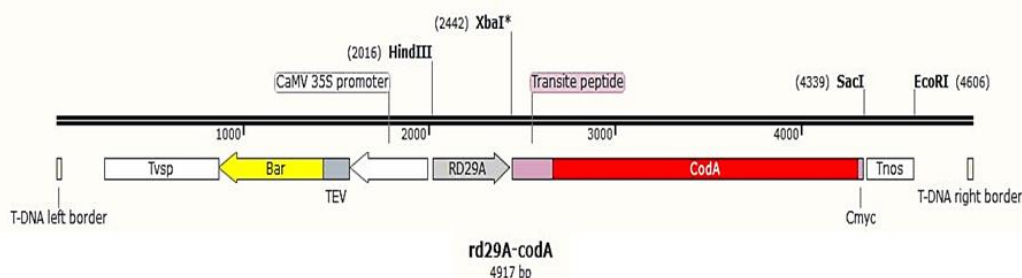
Vector tái tổ hợp pIBTII/*rd29A-CodA* được biến nạp vào chủng khuẩn *A. tumefaciens* C58/pGV2206 tạo *A. tumefaciens* tái tổ hợp. *A. tumefaciens* mang vector pIBTII/*rd29A-CodA* được lây nhiễm vào giống đậu tương DT22 qua nách lá mầm theo phương pháp của Olhoft và cs [8].

Bảng 1. Thành phần môi trường sử dụng trong chuyển gen *CodA* ở đậu tương

Môi trường	Thành phần
Hạt nảy mầm (GM)	Muối B5 3,052 g/l + sucrose 20 g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung vitamin B5 1000X 1 ml/l.
Dịch huyền phù (CCM lỏng)	Muối B5 0,316g/l + BAP 1,7 mg/l + MES 3,9g/l + GA3 0,25 mg/l + sucrose 30 g/l pH = 5,4 có bổ sung acetosyringone 40 mg/l + dithiothreitol 154 mg/l + L-cysteine 400 mg/l + sodium thiosulfate 158 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + BAP 1,67 mg/l + GA ₃ 0,25 mg/l.
Đồng nuôi cấy (CCM đặc)	Muối B5 0,316 g/l + BAP 1,7 mg/l + MES 3,9 g/l + GA3 0,25 mg/l + Sucrose 30 g/l + 6 agar g/l, pH = 5,4 có bổ sung acetosyringone 0,04 g/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + BAP 1,67 mg/l + GA ₃ 0,25 mg/l.
Diệt khuẩn và tạo đa chồi (SIM)	Muối B5 3,052 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l, pH = 5,8, bổ sung BAP 1,67 mg/l + cefotaxim 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l.
Kéo dài chồi (SEM)	MS 4,3 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 200 ml/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxim 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + GA ₃ 500 mg/l + IAA 100 mg/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l.
Ra rễ (RM)	MS 4,3 g/l + sucrose 20 g/l + MES 0,59 g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxim 250 mg/l + IBA 0,1 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l.

Các cụm đa chồi được chọn lọc lần lượt trên môi trường cảm ứng tạo chồi bổ sung 3 mg/l ppt và kéo dài chồi 1,5 mg/l ppt. Các chồi sống sót sau các lần chọn lọc được cắt tạo rễ trên môi trường có bổ sung IBA. Sau 7- 12

ngày, các chồi có bộ rễ hoàn chỉnh được trồng ra đất trong phòng thích nghi sinh trưởng và được kiểm tra sự có mặt của gen chọn lọc và gen đích bằng phương pháp phết chất diệt cỏ và sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử.

**Hình 1.** Vector *pIBTII/rd29A-CodA* sử dụng để biến nạp

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ phosphinothricin (ppt) đến hiệu quả chuyển gen

Một bước quan trọng trong một quy trình biến nạp gen hiệu quả là lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả để cho phép phân biệt giữa tế bào chuyển gen và không chuyển gen bằng cách ức chế tăng sinh và tái tạo [9]. Gen *bar* hoặc gen *pat* được phân lập từ *Streptomyces hygroscopicus* mã hóa enzyme *Phosphinothricin Acetyltransferase*, acetyl hóa nhóm NH₂ của thuốc diệt cỏ *phosphinothricin* khiến thuốc trở nên vô hại [10]. Thực vật mang gen chỉ thị chọn lọc (*bar* hoặc *pat*) có khả năng kháng thuốc diệt cỏ

dựa trên phosphinothricin [11]. Gen *bar* và *pat* đã được sử dụng rộng rãi như các chỉ thị trong thực vật chuyển gen và là công cụ lý tưởng để xác định các mô chuyển gen, thậm chí cả trong điều kiện nhà kính hoặc đồng ruộng [12], [13]. Mức độ nhạy cảm của vật liệu thực vật với ppt phụ thuộc vào kiểu gen và loại mẫu cấy, điều kiện chọn lọc hoặc thành phần của môi trường chọn lọc [14]. Ở phạm vi nồng độ từ 1- 10 mg/l, ppt phù hợp để lựa chọn tế bào được biến nạp với gen *bar* ở hầu hết các loài thực vật [10]. Để xác định hàm lượng ppt sử dụng chọn lọc các chồi chuyển gen thí nghiệm, hạt nảy mầm sau khi gieo 5 ngày thu lá mầm và tiến hành gây tổn

thương tại nách lá mầm và không lây nhiễm khuẩn, đồng nuôi cấy 5 ngày trên môi trường CCM sau đó được cấy ươm tạo chồi trên môi trường SIM1 và SIM2. Ở môi trường SIM1 không bổ sung chất chọn lọc ppt sau 2 tuần cấy ươm tạo chồi. Sau đó các cụm chồi chuyển sang môi trường SIM2, bổ sung ppt với 5 nồng độ (0; 1; 3; 5; 7) mg/l. Theo dõi sau hai tuần, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Sau 14 ngày, trên môi trường SIM2 có chứa 0 mg/l và 1 mg/l ppt, các cụm chồi xanh và phát triển bình thường, trong khi đó, lá của các cụm chồi úa vàng và rụng ở ngày thứ 7 trên môi trường SIM2 có chứa 3-5 mg/l ppt (Hình 2). Trên môi trường SIM2 có chứa 7 mg/l ppt, các cụm chồi chết khô hoàn toàn sau 8 ngày nuôi cấy và tỉ lệ chồi kéo dài giảm theo sự tăng nồng độ của ppt. Sau khoảng 30 ngày, cụm chồi trên các môi trường bổ sung nồng độ ppt 3 mg/l sinh trưởng phát triển chậm, nhưng có hiện tượng tạo cụm chồi mới và xanh. Ở nồng độ ppt 5 mg/l, chồi chết hoàn toàn (Hình 2). Từ các kết quả này, chúng tôi lựa chọn môi trường SIM bổ sung ppt 3,0 mg/l để chọn lọc cây đậu tương chuyển gen.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn *A. tumefaciens* đến khả năng cấy ươm tạo chồi

A. tumefaciens được xem là vi khuẩn tương đối nhạy cảm với điều kiện nuôi cấy. Nồng độ khuẩn khi lây nhiễm là nhân tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*, khi lượng vi khuẩn quá thấp có thể làm giảm tần số tiếp xúc với các mẫu thực vật, ngược lại nếu nồng độ quá cao có thể gây ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của mẫu, thậm chí gây chết mẫu trong quá trình nuôi cấy [15]. Để xác định nồng độ khuẩn *Agrobacterium* ở OD₆₅₀ sử dụng cho chuyển gen vào đậu tương, chúng tôi tiến hành lây nhiễm các mảnh lá mầm hạt đậu tương đã được làm tổn thương tại nách lá mầm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ khác nhau, lần lượt là 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 trong vòng 30 phút, sau đó tiến hành đồng nuôi cấy các mảnh lá mầm đã lây nhiễm trên môi trường CCM. Sau 5 ngày đồng nuôi cấy, các mảnh lá mầm được rửa khuẩn và được cấy chuyển lên môi trường cấy ươm tạo chồi SIM1 không chứa chất chọn lọc trong vòng 14 ngày, sau đó được chuyển sang môi trường SIM2 có bổ sung 3 mg/l ppt. Sau 14 ngày, mảnh lá mầm tiếp tục được chuyển sang môi trường SEM có chứa 1,5 mg/l ppt, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ ppt đến khả năng tạo chồi

Nồng độ ppt mg/l	Số mảnh lá mầm thí nghiệm	Môi trường chọn lọc			
		Số mảnh lá trên môi trường SIM1 không bổ sung ppt sau 14 ngày	Số cụm chồi trên môi trường SIM2 bổ sung ppt 3,0 mg/l sau 14 ngày	Số cụm chồi trên môi trường SEM1 bổ sung ppt 1,5 mg/l sau 14 ngày	Số cụm chồi trên môi trường SEM2 bổ sung ppt 1,5 mg/l sau 14 ngày
0	100	82	82	78	76
1	100	83	45	38	26
3	100	86	23	16	0
5	100	79	16	0	0
7	100	81	0	0	0



Hình 2. Các mảnh lá mầm trên môi trường chọn lọc với nồng độ ppt khác nhau
A: 1 mg/l; B: 3 mg/l ppt; C: 5 mg/l ppt; D: 7 mg/l ppt

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi

Nồng độ <i>Agrobacterium</i> đo ở OD ₆₅₀	Số mảnh lá mầm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 sau 14 ngày không bổ sung ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 sau 14 ngày có bổ sung 3,0 mg/l ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM sau 14 ngày có bổ sung 1,5 mg/l ppt
0,4	60	48	12	5
0,6	60	45	18	17
0,8	60	29	11	6
1,0	60	20	10	4
Tổng	240	98	55	32

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM1 không chứa ppt, không thấy sự sai khác nhiều về khả năng tạo chồi của mảnh lá mầm khi được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,4 và 0,6. Đối với các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,8 và 1,0, tỷ lệ tái nhiễm khuẩn của các mảnh lá mầm rất cao, các mảnh lá mầm thường chết và không tạo đa chồi. Các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,4 và 0,6 tiếp tục được chọn lọc trên môi trường SIM2 và SEM có bổ sung ppt. Sau 14 ngày nuôi cấy chọn lọc, các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ 0,6 vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát sinh chồi, trong khi các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ 0,4 gần như chết hoàn toàn trên môi trường chọn lọc. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ đạt 0,6 để sử dụng cho biến nạp.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens* và đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22 được thực hiện với các khoảng thời gian ủ lần lượt là: 15 phút; 30 phút; 45 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, 5 ngày và 8 ngày, kết quả được trình bày ở bảng 4. Kết quả bảng 4 cho thấy, với thời gian lây nhiễm 15 phút, các cụm mầm bị chết gần như hoàn toàn ở giai đoạn cuối của chọn lọc lần 1; thời gian lây nhiễm 45 phút, tỷ lệ nhiễm lại khuẩn rất cao và loại bỏ nhiều ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi SIM1. Ở thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, các mảnh lá mầm nhỏ hơn nhiều so với đồng nuôi cấy 5 ngày và 8 ngày, nhưng với thời gian

đồng nuôi cấy 8 ngày khuẩn mọc lại rất cao đến ngày thứ 6 của đồng nuôi cấy khuẩn mọc lan ra ngoài của giấy lọc và đến ngày thứ 8 một số mảnh bị thối. Vì vậy, thời gian lây nhiễm 30 phút và đồng nuôi cấy 5 ngày cho kết quả tốt nhất để sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22.

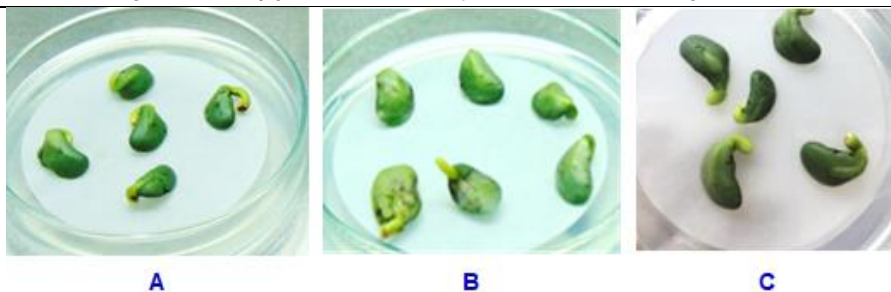
3.4. Ảnh hưởng của kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến hiệu quả chuyển gen

Xác định kháng sinh và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy là yếu tố quan trọng đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau khi được lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Sử dụng kháng sinh diệt khuẩn phổ rộng cefotaxime với nồng độ lần lượt là 200 mg/l, 500 mg/l và 1000 mg/l bổ sung vào môi trường rửa khuẩn (SIM lỏng) với thời gian rửa 5 phút, 10 phút, và 15 phút.

Các mảnh lá mầm sau khi đồng nuôi cấy 5 ngày, gấp nhẹ vào bình tam giác 250 ml rửa bằng nước cất khử trùng 3 lần thời gian 2 phút/lần, tiếp tục rửa 1 lần với môi trường SIM lỏng có bổ sung kháng sinh ở các nồng độ khác nhau và thời gian khác nhau. Sau đó, cấy chuyển trên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM1 2 tuần; tiếp tục chuyển sang môi trường SIM2 và SEM1 có chất chọn lọc 4 tuần. Kết quả qua từng giai đoạn cho thấy, nồng độ cefotaxime 500 mg/l được bổ sung vào môi trường diệt khuẩn rửa trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất. Ở nồng độ cefotaxim 1000 mg/l, các mảnh lá mầm tạo đa chồi kém, tại vị trí nách lá mầm sau khi tạo tổn thương bị đen và không tạo được cụm đa chồi. Ở nồng độ cefotaxime 200 mg/l, các mảnh lá mầm bị tái nhiễm khuẩn rất cao, chỉ sau tuần đầu cảm ứng tạo chồi, hầu hết các mảnh đều bị nhiễm lại khuẩn (Bảng 5).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi

Thời gian ngâm mảnh lá mầm trong dịch khuẩn (phút)	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Số mảnh lá mầm làm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 sau 14 ngày không bổ sung ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 sau 14 ngày có bổ sung 3,0 mg/l ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM sau 14 ngày có bổ sung 1,5 mg/l ppt
15	2	90	88	21	0
	5	90	86	26	4
	8	90	38	18	0
30	2	90	84	31	13
	5	90	76	68	38
	8	90	35	12	0
45	2	90	42	30	0
	5	90	31	13	0
	8	90	17	8	0

**Hình 3.** Các mảnh lá mầm sau các thời gian đồng nuôi cấy khác nhau
A: 2 ngày; B: 5 ngày; C: 8 ngày**Bảng 5.** Ảnh hưởng của kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau chuyển gen

Thời gian rửa khuẩn (phút)	Kháng sinh diệt khuẩn) Cefotaxime (mg/l)	Số mảnh lá mầm làm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 sau 14 ngày không bổ sung ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 sau 14 ngày có bổ sung 3,0 mg/l ppt	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM sau 14 ngày có bổ sung 1,5 mg/l ppt
5	200	60	28	31	6
	500	60	36	46	8
	1000	60	18	18	3
10	200	60	38	26	13
	500	60	46	38	24
	1000	60	12	9	0
15	200	60	17	14	8
	500	60	17	13	0
	1000	60	8	5	0

4. Kết luận

Các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *CodA* và tạo đa chồi ở giống đậu tương ĐT22 đã được xác định. Nồng độ ppt 3,0 mg/l sử dụng chọn lọc ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi và ppt 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ bằng 0,6 với thời gian ủ khuẩn 30 phút,

đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. J. Su, R. Hirji, L. Zhang, C. He, G. Selvaraj, and R. Wu, "Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in

- transgenic rice as a strategy for producing the stress protectant glycine betaine,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, pp. 1129-1135, 2006.
- [2]. K. Shirasawa, T. Takabe, T. Takabe, and S. Kishitani, “Accumulation of Glycinebetaine in Rice Plants that Overexpress Choline Monoxygenase from Spinach and Evaluation of their Tolerance to Abiotic Stress,” *Annals of Botany*, vol. 98, pp. 565-571, 2006.
- [3]. E. J. Park, Z. Jeknic, T. H. H. Chen, and N. Murata, “The *codA* transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato,” *Plant Biotechnology Journal*, vol. 5, pp. 422-430, 2007.
- [4]. X. Yu, A. Kikuchi, E. Matsunaga, Y. Morishita, and K. Nanto, “Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted-house,” *Plant Biotechnol*, vol. 26, pp. 135-141, 2009.
- [5]. Q. H. Nguyen, L. T. K. Vu, L. T. N. Nguyen, N. T. T. Pham, Y. T. H. Nguyen, S. V. Le, and M. H. Chu, “Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants,” *Scientific Reports*, vol. 9, p. 19663, 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55895-0>.
- [6]. H. Q. Nguyen, T. H. T. Le, T. N. L. Nguyen, T. G. Nguyen, D. T. Sy, Q. T. Tu, T. T. T. Vu, V. S. Le, H. M. Chu, and T. K. L. Vu, “Overexpressing *GmCHI1A* increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds,” *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10076-x>.
- [7]. 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.
- [8]. P. O. Olhoft, and D. S. Somers, “L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells,” *Plant Cell Reports*, vol. 20, pp. 706-711, 2001.
- [9]. S. K. Datta, “Impact of plant biotechnology in agriculture,” in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, E.C. Pua and M. R. Davey (eds), Transgenic crops IV. Springer, USA, 2007, vol. 59, pp. 3-31.
- [10]. H. Liang, P. A. Kumar, V. Nain, W. A. Powell, and J. E. Carlson, “Selection and screening strategies,” in *Transgenic Crop Plants*, C. Kole, C. H. Michler, A. G. Abbott and T.C. 538 Hall (eds), Springer, USA, 2010, vol.1: Principles and Development, pp. 85-143.
- [11]. N.G. Halford, *Genetically Modified Crops*. Ed. Imperial College Press, UK, 2003.
- [12]. C. Longo, C. Lickwar, Q. Hu, K. Nelson-Vasilchik, D. Viola, J. Hague, J. M. Chandlee, H. Luo, and A. P. Kausch, “Turf grasses,” in *Methods in Molecular Biology 344, Agrobacterium Protocols*, K. Wang, (ed), Humana Press Inc, USA, 2006, vol. 2, pp. 83-95.
- [13]. K. H. Neumann, A. Kumar, and J. Imani, “Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology”, in *Basics and Application*. Springer, USA, 2009.
- [14]. L. Khelifi, T. H. K. Moussa, S. Cerezo-Medina, J. A. Mercado, F. Pliego-Alfaro, and K. Titouh, “Evaluation of the Effect of Phosphinothricin, as Selection Agent, on the Growth of Olive Somatic Embryos,” *Acta Horticulturae (ISHS)*, pp. 533-542, 2012.
- [15]. V. P. Nguyen, H. D. Chen, C. Y. Ji, W. Teng, J. W. Li, Y. Wang, X.W. Li, W. Ahmad, V. D. Pham, and Q.Y. Wang, “The influence of some factors on *GmMYB12A* gene transfer efficiency in soybean,” *Journal of Forest Science and Technology*, no. 2, pp. 10-19, 2014.