

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO CÂY DƯA HẦU (*Citrullus lanatus* Thumb.)

Nguyễn Thị Thanh Nga<sup>1\*</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>2</sup>, Phạm Thị Vân<sup>2</sup>,  
Nguyễn Tường Vân<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Lê Trần Bình<sup>2</sup>

<sup>(1\*)</sup>Đại học Tây Bắc, ngantt253@gmail.com

<sup>(2)</sup>Viện Công nghệ sinh học

**TÓM TẮT:** Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu hóa quy trình chuyển gen hiệu quả vào cây dưa hấu của Việt Nam thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Chúng vi khuẩn CV58 mang vector nhị phân pCB-gusplus chứa gen chọn lọc kháng kanamycin *nptII* (neomycin Phosphotransferase) và gen chỉ thị *Gus-intron* ( $\beta$ -Glucuronidase) được dùng để chuẩn hóa. Vật liệu chuyển gen là các mảnh lá mầm 5-7 ngày tuổi được nhiễm với vi khuẩn ở nồng độ OD<sub>600</sub> 0,7 trong 30 phút. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các mảnh lá mầm được tái sinh trên môi trường chọn lọc MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA, 200 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime. Các chồi chuyển gen ra rễ trên môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l IBA, 100 mg/l kanamycin và 250 mg/l cefotaxime. Có sự khác nhau đáng kể về hiệu quả chuyển gen của các dòng dưa hấu khác nhau. Dòng L2 (F1 TG939) cho hiệu quả chuyển gen là 1,87%, tiếp đến là dòng D2 (F9 Tiêu Long - Thăng Long) 1,85%, các dòng dưa hấu L1 (F1 Kinhkong) và D1 (có nguồn gốc Bình Thuận) cho hiệu quả chuyển gen là 0%. Kết quả phân tích cây chuyển gen thông qua biểu hiện của gen gus và phản ứng PCR với gen chọn lọc *nptII* đã khẳng định sự có mặt ổn định của gen được chuyển trong cây chuyển gen.

*Từ khóa:* *Agrobacterium*, chuyển gen, dưa hấu, gen gus, kanamycin.

### MỞ ĐẦU

Dưa hấu (*Citrullus lanatus* Thumb.) là cây trồng quan trọng thuộc họ Bầu bí, có nguồn gốc từ châu Phi và Nam châu Á. Quả dưa hấu có giá trị dinh dưỡng và thương mại cao, có thể dùng ăn trực tiếp, làm salad, nước ép, kẹo và ăn hạt. Giá trị dinh dưỡng của dưa hấu không chỉ bởi vị ngọt, mát của nó mà còn vì quả dưa hấu chứa một hàm lượng lớn chất xơ, nhiều loại vitamin khác nhau và khoáng chất, hạt dưa hấu rất giàu chất béo và protein [5, 13, 17].

Một trong những khó khăn trong quá trình sản xuất dưa hấu là cây rất dễ bị nhiễm các bệnh do vi khuẩn, virus hay do nấm gây ra [4, 9, 14], ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng quả. Cho đến nay, ngoài các biện pháp truyền thống như cải thiện kỹ thuật canh tác, phun thuốc phòng và trừ sâu bệnh thì chuyển gen để tạo giống dưa hấu kháng bệnh là một trong những hướng đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [9, 12, 18, 19].

Ở Việt Nam, những nghiên cứu về dưa hấu tập trung chủ yếu vào các biện pháp nông học nhằm nâng cao năng suất, chất lượng dưa hấu [15], so sánh các chỉ tiêu năng suất, chất lượng

của các giống dưa hấu hiện có tại Việt Nam [16], nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu hoạch và bảo quản dưa hấu [8]. Một vài nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy mô trong việc nhân nhanh các giống dưa hấu phục vụ cho công tác giống cũng đã được tiến hành [6, 7, 10, 11]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công bố nào về chuyển gen vào cây dưa hấu. Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xây dựng được quy trình chuyển gen vào cây dưa hấu để phục vụ cho công tác giống.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu

Hạt dưa hấu của các giống lai Hắc Mỹ nhân F1 Kinhkong (L1), F1 TG939 (L2), con lai ở thế hệ F9 (cho tự thụ phấn) của dòng 1 có nguồn gốc Bình Thuận (quả có vỏ đen, tròn, to, ruột đỏ-D1) và dòng 2 có nguồn gốc từ giống F1-Tiêu Long-Thăng Long (quả có vỏ xanh, hình trứng, to, ruột đỏ-D2) được sử dụng trong nghiên cứu này.

#### Quy trình chuyển gen

Chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58

chứa vector pCB-gusplus được nuôi lắc qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ xung 50 mg/l rifamycin, 50 mg/l kanamycin ở 28°C. Sáu nồng độ vi khuẩn đã được thử nghiệm (0,0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1) để đánh giá ảnh hưởng của chúng đến hiệu quả quá trình chuyển gen vào 30 mảnh lá mầm của các dòng dưa hấu nghiên cứu. Vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm với vận tốc 4500 v/p trong 15 phút và sau đó hòa tan khuẩn trong 50ml môi trường MS có bổ xung 200  $\mu$ M AS, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA để tiến hành biến nạp (dung dịch hòa tan khuẩn).

Để tìm ngưỡng chọn lọc thích hợp, các chồi dưa hấu D2 (không chuyển gen) được nuôi trên môi trường có bổ sung các nồng độ kanamycin khác nhau (0, 50, 100, 150, 200 mg/l) để đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ chất chọn lọc kanamycin đến khả năng sinh trưởng, phát triển của chồi dưa hấu.

Hạt dưa hấu được nảy mầm trên môi trường MS trong tối ở 28°C. Sau 5-7 ngày, các mảnh lá mầm được cắt thành những mảnh có kích thước khoảng 1-2 mm<sup>2</sup>, sử dụng đầu lưỡi dao để tạo thêm các vết thương trên mặt lá rồi ngâm vào dung dịch hòa tan khuẩn trong từ 15, 30 đến 45 phút. Tiếp theo, các mảnh lá được thấm khô và chuyển vào môi trường đồng nuôi cấy (MS có bổ xung 3% sucrose, 200  $\mu$ M AS, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA, 0,8% agarose). Sau 3, 5, 7 ngày, các mảnh lá mầm được rửa khuẩn trong nước cất khử trùng có bổ xung 500 mg/l cefotaxime, thấm khô và chuyển vào môi trường tái sinh (MS bổ xung 3% sucrose, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA, 0,8% agarose, 200 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime). Việc tái sinh chồi từ các mảnh lá mầm được thực hiện ở 25  $\pm$  2°C với chế độ chiếu sáng 8/16 h và cường độ chiếu sáng 2000 lux. Sau 6 tuần, các chồi hoặc cụm chồi thu được được chuyển sang môi trường tạo rễ hoặc môi trường kéo dài chồi (MS bổ xung 0,1 mg/l IBA, 0,5 mg/l GA3, 150 mg/l kanamycin, 500 mg/l cefotaxime) trong 2-3 tuần, tùy thuộc vào độ lớn của chồi.

Các chồi tái sinh được chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ (MS bổ xung 0,2 mg/l IBA, 100 mg/l kanamycin, 250 mg/l cefotaxime) trong 2-3 tuần. Các cây hoàn chỉnh sẽ được chuyển sang giá thể trấu hun ngoài nhà kính trước khi tiến hành đánh giá cây chuyển gen.

### Kiểm tra biểu hiện của gen *gus*

Biểu hiện tạm thời hay ổn định của gen *gus* được phân tích theo phương pháp của Jefferson (1987). Các mảnh lá mầm sau 3 ngày đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Agrobacterium* hoặc các bộ phận của chồi dưa hấu được hình thành trên môi trường chọn lọc được ngâm trong dung dịch X-gluc (Tris/NaCl pH7,2 + 10 mg/ml X-gluc + 10% Triton X-100) và ủ ở nhiệt 37°C trong 24-36 h. Mảnh lá hoặc mô sẽ được tẩy hết diệp lục nhiều lần với cồn 70% và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Mẫu được chuyển gen *gus* sẽ có màu xanh chàm đặc trưng. Mức độ biểu hiện của gen *gus* được đánh giá thông qua mức phân bố và độ đậm của màu xanh chàm trên các mô kiểm tra.

### Phân tích cây chuyển gen thông qua phản ứng PCR

Phản ứng PCR của các dòng dưa hấu chuyển gen được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu cho gen chọn lọc *nptII*. Trình tự cặp mồi sử dụng là: 5'-CGGCAACAGGATTCAATCTT-3' và 5'-AAGGGACTGGCTGCTATTGG-3', kích thước đoạn gen *nptII* nhân lên được là 963 bp. Phản ứng được tiến hành với chu kỳ nhiệt như sau: một chu kỳ 94°C trong 4 phút, 30 chu kỳ 94°C trong 1 phút, 52°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm với ethidium bromide và quan sát dưới đèn UV.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Đánh giá khả năng sống sót của cây dưa hấu trên môi trường chứa chất chọn lọc kanamycin

Việc chọn lọc và xác định những cá thể mang gen chuyển là khâu rất quan trọng trong quá trình chuyển gen. Để chọn lọc có hiệu quả, cần xác định được nồng độ chất chọn lọc phù hợp giúp cho việc loại bỏ phần lớn những cá thể không được chuyển gen, đồng thời giữ lại các cá thể được chuyển gen. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vector pCB-gusplus chứa gen chọn lọc *nptII* kháng kháng sinh kanamycin.

Chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ kanamycin 0, 50, 100, 150, 200 mg/l đến phát triển của cây dưa hấu D2 trong 6 tuần nhằm xác định ngưỡng nồng độ phù hợp cho việc chọn lọc cây dưa hấu chuyển gen.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của kanamycin đến sự phát triển của chồi

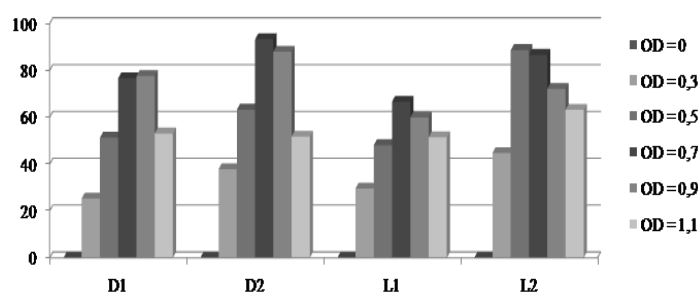
Nồng độ kanamycin (mg/l)	Số chồi cảm ứng	Số chồi sống	Số chồi chết	Tỷ lệ sống sót (%)
0	30	30	30	100
50	45	23	22	51,1
100	45	6	39	13,3
150	42	3	39	7,1
200	48	1	37	2,1

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, kanamycin có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sống sót, sinh trưởng, phát triển của các chồi đưa hầu được nuôi cấy. Ngay nồng độ 50 mg/l đã có gần 50% cây bị chết sau 6 tuần nuôi cấy và tỷ lệ này là 2,1% với nồng độ 200 mg/l. Trong một vài công bố về chuyển gen vào dưa hấu, nồng độ kanamycin được sử dụng giao động từ 20 mg/l đến 125 mg/l [1, 9, 12]. Theo Brukhin et al. (2000) [2], ngưỡng nồng độ chất chọn lọc phù hợp là khi nó loại bỏ được khoảng 90% các cây không chuyển gen. Căn cứ vào kết quả trên, chúng tôi lựa chọn kanamycin 100 mg/l là ngưỡng chọn lọc cho các dòng dưa hấu chuyển gen của Việt Nam.

#### Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn ( $OD_{600}$ ) đến hiệu quả chuyển gen

Các mảnh lá mầm (30 mảnh cho mỗi dòng)

được ngâm trong sáu nồng độ vi khuẩn *Agrobacterium*  $OD_{600}$  0,0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 trong thời gian 30 phút. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các mảnh lá mầm được nhuộm với dung dịch X-gluc và đánh giá biểu hiện tạm thời của gen gus trong mô biến nạp. Kết quả thể hiện trên hình 1 cho thấy, nồng độ vi khuẩn ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chuyển gen. Hiệu quả chuyển gen tăng từ 2 đến 4 lần khi tăng nồng độ vi khuẩn từ  $OD = 0,3$  đến  $OD = 0,7$ . Nồng độ vi khuẩn  $OD_{600} = 0,5$  và  $0,7$  là thích hợp nhất cho dòng dưa hấu L2 và là  $0,7$  và  $0,9$  cho dòng dưa hấu D2 với tần số chuyển gen đạt tỷ lệ lần lượt là 86,67 và 93,33%. Với các dòng còn lại, mặc dù tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen gus không cao bằng nhưng ở nồng độ khuẩn  $OD_{600} = 0,7$  cũng cho kết quả cao hơn các nồng độ còn lại, vì vậy chúng tôi lựa chọn nồng độ vi khuẩn này cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Hình 1.** Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn ( $OD_{600}$ ) đến biểu hiện Gus

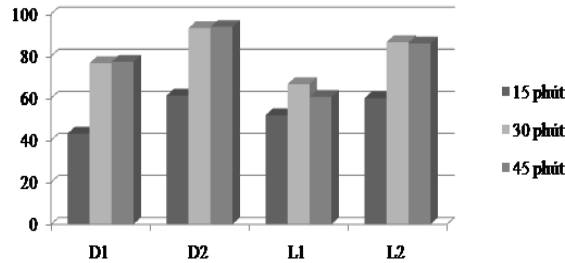
#### Ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu quả chuyển gen

Để xác định thời gian lây nhiễm tối ưu cho việc chuyển gen, các mảnh lá mầm (30 mẫu/công thức) được lây nhiễm với vi khuẩn trong 15, 30 và 45 phút ở nhiệt độ phòng với nồng độ vi khuẩn ( $OD_{600}$ ) = 0,7. Sự có mặt tạm

thời của gen gus được phân tích sau 3 ngày đồng nuôi cấy. Kết quả cho thấy, thời gian lây nhiễm 30 phút cho tỷ lệ biểu hiện gus cao nhất ở dưa hấu D2 (93,33%) và L2 (86,67%) (hình 2). Thời gian lây nhiễm kéo dài 45 phút dường như không có tác dụng, chỉ làm tăng tỷ lệ biểu hiện gen gus ở dưa hấu D1 và D2 lên 0,53 và 0,54%, nhưng lại làm giảm tỷ lệ này ở dưa hấu

L1 (6,1%) và L2 (0,73%) so với thời gian lây nhiễm 30 phút. Mức độ biểu hiện gen gus ở các dòng dưa hấu khi được lây nhiễm trong 30 và

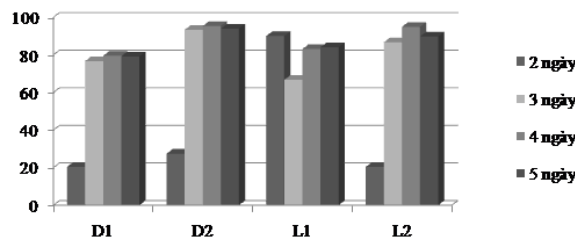
45 phút cũng không có sự khác biệt đáng kể. Vì vậy, thời gian lây nhiễm 30 phút là ngưỡng được chọn để chuyển gen vào dưa hấu.



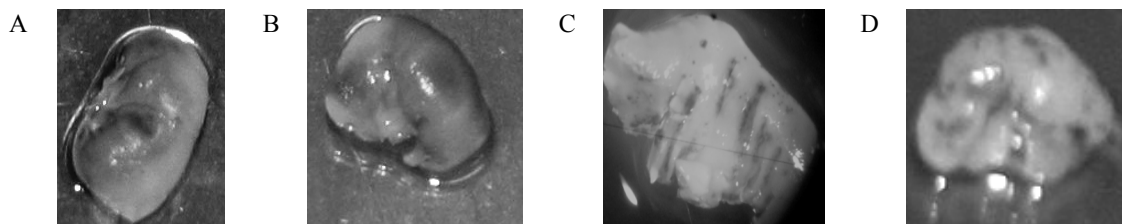
Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến biểu hiện Gus

Thời gian đồng nuôi cấy giữa vật liệu thực vật và vi khuẩn *Agrobacterium* là một trong những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình chuyển gen. Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian đồng nuôi cấy cũng được thử nghiệm. Mảnh lá mầm của các dòng dưa hấu được biến nạp với vi khuẩn ( $OD_{600} = 0,7$  trong 30 phút và được đồng nuôi cấy trong thời gian 2, 3, 4 và 5 ngày. Sau đó, nhuộm các mảnh lá mầm với X-gluc để đánh giá biểu hiện tạm thời của gen gus. Kết quả phân tích biểu hiện của gen gus (hình 3) cho thấy, thời gian đồng nuôi có ảnh hưởng khác nhau trên các dòng

nghiên cứu. Tỷ lệ biểu hiện gen gus cao cho dòng D2 và L2 (trên 90%) là sau thời gian đồng nuôi cấy 3 hoặc 4 ngày. Trong khi đó, đối với L1 là 2 ngày và D1 lại không có biến động nếu tăng từ 2 ngày lên 4 hoặc 5 ngày. Tuy nhiên, đối với dòng có phản ứng tốt với *Agrobacterium* như D2 và L2 mặc dù tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen gus cao nhất ở 4 ngày nhưng nguy cơ phát triển quá mức của *Agrobacterium* ở môi trường chọn lọc lại cao. Vì thế chúng tôi đã lựa chọn ngưỡng 3 ngày đồng nuôi cấy để chuyển gen vào hai dòng dưa hấu trên.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến biểu hiện gus



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến biểu hiện gus

A.  $OD_{600} = 0,7$ ; thời gian lây nhiễm 30 phút; B.  $OD_{600} = 0,7$ ; thời gian lây nhiễm 45 phút; C.  $OD_{600} = 0,3$ ; thời gian lây nhiễm 30 phút; D.  $OD_{600} = 0,9$ ; thời gian lây nhiễm 30 phút

### Ảnh hưởng của kiểu gen dòng gốc đến biểu hiện tạm thời của gen gus

Kết quả biểu hiện tạm thời của gen gus trong các mảnh lá sau 3 ngày đồng nuôi cấy cho thấy, khả năng lây nhiễm vi khuẩn vào mẫu nghiên cứu là khác nhau rõ rệt đối với từng dòng. Trong các dòng nghiên cứu, dòng dưa hấu D2 cho hiệu quả biến nạp là cao nhất, với

93,33% các mảnh lá có biểu hiện tạm thời gen gus, đồng thời mức độ biểu hiện của gen gus ở D2 cũng cao hơn các dòng còn lại (bảng 2). Tỷ lệ biểu hiện gen tạm thời thấp nhất ở L1 và mức độ biểu hiện tạm thời của gen gus lại thấp nhất ở dòng D1. Sự khác biệt về mức độ lây nhiễm và biểu hiện của gen gus như trên có thể là do yếu tố di truyền quyết định.

Bảng 2. Kết quả biểu hiện tạm thời của gen gus

Lô thí nghiệm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+) gus	Tỷ lệ (%)	Mức độ biểu hiện
D1	30	23	76,67	(+)
D2	30	28	93,33	(+++)
L1	30	20	66,67	(++)
L2	30	26	86,67	(+++)

### Phân tích và đánh giá cây chuyển gen

Sau khi tối ưu các yếu tố chủ yếu ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen tạm thời ở dưa hấu, chúng tôi có được quy trình chuyển gen như sau. Lá mầm 5-7 ngày tuổi được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước khoảng 1-2 mm<sup>2</sup>, rồi ngâm vào dung dịch hòa tan khuẩn trong 30 phút. Sau đó, các mảnh lá được thấm khô và chuyển vào môi trường đồng nuôi cấy (MS có bổ xung 3% sucrose, 200 µMAS, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA, 0,8% agarose). Sau 3 ngày, các mảnh lá mầm được rửa khuẩn trong nước cất khử trùng có bổ xung 500 mg/l cefotaxime, thấm khô và

chuyển vào môi trường tái sinh (MS bổ xung 3% sucrose, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA, 0,8% agarose, 200 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime). Sau 6 tuần, các chồi hoặc cụm chồi thu được sẽ được chuyển sang môi trường tạo rễ (MS bổ xung 0,2 mg/l IBA, 100 mg/l kanamycin, 250 mg/l cefotaxime) hoặc môi trường kéo dài chồi (MS bổ xung 0,1 mg/l IBA, 0,5 mg/l GA3, 150 mg/l kanamycin, 500 mg/l cefotaxime) trong 2-3 tuần tùy thuộc vào độ lớn của chồi. Các cây hoàn chỉnh sẽ được chuyển sang giá thể trấu hun ngoài nhà kính trước khi tiến hành đánh giá cây chuyển gen.

Bảng 3. Kết quả biến nạp gen gus vào dưa hấu

LTN	MTN	SSCL	MTC	TSC	CRR	(+) GUS	(+) PCR	TLCG
WT	30	0	0	0	0	0	0	0
D1	142	67	21	29	5	0	0	0
D2	162	97	48	57	11	3	3	1,85
L1	167	81	31	43	8	0	0	0
L2	107	59	41	54	12	2	2	1,87

LTN. Lô thí nghiệm; MTN. Số mẫu thí nghiệm; SSCL. Mẫu sống sau chọn lọc; MTC. Số mẫu tạo chồi; TSC. Tổng số chồi; CRR. Số chồi ra rễ; (+) GUS. Số chồi biểu hiện gus; (+) PCR. Số chồi (+) với cặp môi đặc hiệu của gen nptII; TLCG. Tỷ lệ chuyển gen (%).

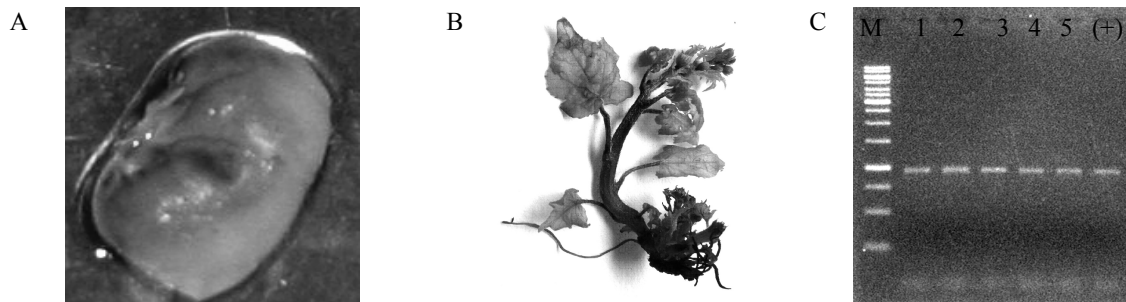
Kết quả chuyển gen được thể hiện ở bảng 3 cho thấy, 4 dòng dưa hấu cho hiệu quả chuyển gen ổn định rất khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ các mảnh lá mầm sống sót trên môi trường chọn lọc giao động từ 47,18% (D1) đến 59,88% (D2); tỷ lệ các mảnh lá mầm tái sinh thành chồi

từ các mảnh sống sót trên môi trường chọn lọc giao động từ 31,34% (D1) đến 69,49% (L2). Tổng số chồi thu được ở 4 dòng dưa hấu nghiên cứu giao động từ 29 (D2) đến 57 (D3) chồi, tỷ lệ tạo rễ từ các chồi thu được giao động từ 17,24% (D1) đến 22,22% (L2). Sau khi nhuộm

X-gluc thu được 5 dòng cây (+) với *gus*, trong đó 3 dòng được tái sinh từ D2 và 2 dòng tái sinh từ L2. Tỷ lệ chuyển gen ở dòng D2 là 1,85% và ở L2 là 1,87%. Dòng D1 và L1 không tạo được cây chuyển gen. Kết quả này một lần nữa khẳng định khả năng chuyển gen ở các dòng khác nhau là không giống nhau.

Các cây được chuyển gen ổn định đều cho

phản ứng dương tính với gen *gus*. Mức độ biểu hiện của *gus* khá mạnh, màu xanh đậm xuất hiện ở cả rễ, thân cây, lá cây, đỉnh chồi, hoa. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *nptII* ở 5 dòng dưa hấu chuyển gen cho thấy, có sự xuất hiện một vệt DNA với kích thước xấp xỉ 1000bp tương ứng với kích thước lý thuyết của đoạn gen *nptII* được nhân bản (hình 5).

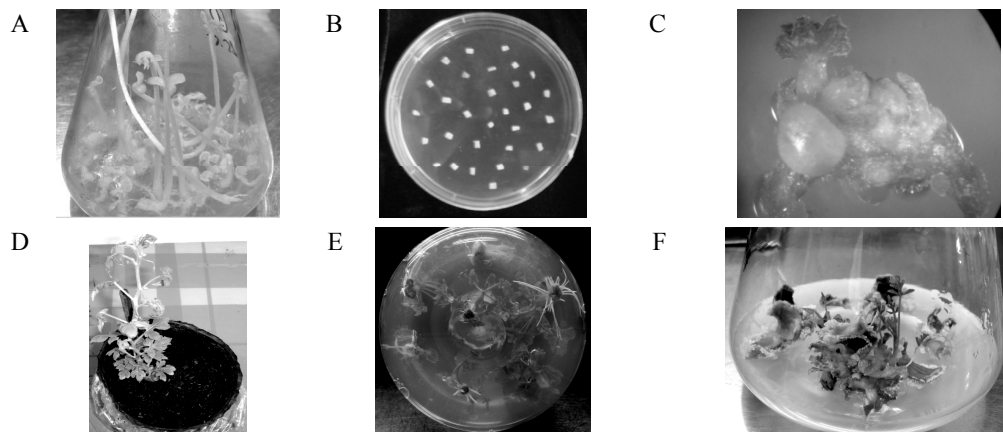


Hình 5. Hình ảnh chuyển gen cây dưa hấu

A. Biểu hiện *gus* tạm thời ở các mảnh lá mầm sau 3 ngày đồng nuôi cấy; B. Biểu hiện *gus* bền vững ở cây chuyển gen. C. Kết quả điện di sản phẩm PCR 5 dòng cây chuyển gen *gus* với cặp mồi đặc hiệu của gen *nptII* (M: Maker 1kb; 1-5. Các dòng dưa hấu chuyển gen *gus* thu được; (+). đối chứng dương).

Hiệu quả chuyển gen vào dưa hấu phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như kiểu gen, chủng vi khuẩn, vector sử dụng và các bước trong quá trình chuyển gen.... Gen *gus* đã được dùng để tối ưu hóa quy trình chuyển gen và chuyển thành công trên nhiều giống dưa hấu khác nhau. Hiệu suất chuyển gen được thông báo dao động

từ 0% đến 10,28% [14, 3, 9]. Quy trình chuyển gen của chúng tôi áp dụng trên các dòng địa phương cũng thu được kết quả tương tự và vì vậy, quy trình này có thể ứng dụng để chuyển gen mục tiêu khác nhau vào hai dòng dưa hấu D2 và L2. Quy trình chuyển gen được trình bày ở hình 6.



Hình 6. Quy trình chuyển gen vào cây dưa hấu

A. Hạt nảy mầm trên môi trường MS; B. Mảnh lá mầm trên môi trường đồng nuôi cấy; C. Chồi hình thành sau 7-10 ngày trên môi trường tái sinh; D. Chồi hình thành sau 4-6 tuần trên môi trường tái sinh; E. Chọn lọc chồi trên môi trường ra rễ; F. Cây con trồng trên giá thể trấu hun.

**KẾT LUẬN**

Đã nghiên cứu thành công quy trình chuyển gen *gus* vào cây dưa hấu có nguồn gốc Việt Nam thông qua chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 chứa vector pCB-gus. Quy trình này có thể được sử dụng cho việc chuyển gen mục tiêu mong muốn vào dưa hấu Việt Nam.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Akashi K., Morikawa K., Yokota A., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation system for the drought and excess light stress-tolerant wild watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Biotechnol.*, 22(1): 13-18.
- Brukhin V., Clapham D., Elfstrand M., Arnol S. V., 2000. Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. *Plant Cell Rep.*, 19: 889-903.
- Cho M. A., Moon C. Y., Liu L. R., Choi P. S., 2008. *Agrobacterium* - mediated transformation in *Citrullus lanatus*. *Biologia Plantarum*, 52(2): 365-369.
- Compton M. E., 1999. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 58: 185-188.
- Compton M. E., Gray D. J., Gaba V. P., 2004. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 77: 231-243.
- Lâm Ngọc Phương, Nguyễn Bảo Vệ, Đỗ Thị Trang Nhã, 2005. Nhân chồi dưa hấu tam bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.) từ chồi đỉnh trên môi trường MS có cytokinin và auxin. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2: 30, 31 & 35.
- Lâm Ngọc Phương, Nguyễn Bảo Vệ, 2006. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA, BA và than hoạt tính đến sự tạo rễ của chồi dưa hấu tam bội in vitro (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2: 39-44.
- Lê Văn Việt Mẫn, Trần Quốc Huy, 2008. Nghiên cứu kéo dài thời gian bảo quản dưa hấu tươi cắt miếng bằng phương pháp xử lý ozone. *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*, 9(11): 77-82.
- Li J., Tang Y., Qin Y., Li X., Li H., 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Afr. J. Biotechnol.*, 11(24): 6450-6456.
- Nguyễn Thị Phương Thảo, Ninh Thị Thảo, Vũ Thị Hà, 2010. Nghiên cứu nhân nhanh in vitro cây dưa hấu (*Citrullus lanatus*). *Tạp chí Khoa học và Phát triển, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*, 3(8): 418-425.
- Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Tường Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, 2010. Nghiên cứu quy trình tái sinh in vitro cây dưa hấu (*Citrullus lanatus* Thumb.). *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8(3B): 1353-1358.
- Park S. M., Lee J. S., Jegal S., Jeon B. Y., Jung M., Park Y. S., Han S. L., Shin Y. S., Her N. H., Lee J. H., Lee M. Y., Ryu K. H., Yang S. G., Harn C. H., 2005. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Rep.*, 24: 350-356.
- Sultana R. S., Bari M. A., 2003. Effect of Different Plant Growth Regulators on Direct Regeneration of Watermelon (*Citrullus lanatus* Thumb.). *Plant Tiss. Cult.*, 13(2): 173-177.
- Suratman F., Huyop F., Wagiran A., Rahmat Z., Ghazali H., Parveez G. K. A., 2010. Cotyledon with Hypocotyl Segment as an Explant for the Production of Transgenic *Citrullus vulgaris* Schrad (Watermelon) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol.*, 9(2): 106-118.
- Trần Đình Nguyễn, Trần Thị Ba, 2008. Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật tạo trái dưa hấu hình vuông phục vụ chung tết. *Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Cần Thơ*, 9: 128-135.
- Trần Thị Ba, Võ Thị Bích Thủy, 2004. So sánh năng suất và phẩm chất một số giống dưa hấu tại ngoại thành thành phố Cần Thơ từ năm 2001-2003. *Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Cần Thơ*, 2: 131-137.

17. Wehner T. C., 2008. Watermelon. (p. 381-418). In: J. Prohens and F. Nuez, eds. Handbook of Plant Breeding. Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae and Cucurbitaceae. Springer Science+Business LLC, New York, NY, 426 p.17.
18. Yang C. F., Yu T. A., Chiang C. H., Wu H. W., Li C. M., Chen J. H., và Yeh S. D., 2011. Generation of transgenic watermelon resistant to Zucchini yellow mosaic virus and Papaya ringspot virus type W. Plant Cell Rep., 30(3): 359-371.
19. Zhong W. H., Jie Z. P., Chen X. J., Huai Z., Sheng Z. H., 2003. Virus Resistance in Transgenic Watermelon Plants Containing a WMV-2 Coat Protein Gene. J. G. G., 30(1): 70-75.

## OPTIMISATION OF GENETIC TRANSFORMATION PROCEDURE FOR WATERMELON (*Citrullus lanatus* Thumb.)

Nguyen Thi Thanh Nga<sup>1</sup>, Ho Mạnh Tuong<sup>2</sup>, Pham Thi Van<sup>2</sup>,  
Nguyen Tuong Van<sup>2</sup>, Chu Hoang Ha<sup>2</sup>, Le Tran Binh<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup>Tay Bac University

<sup>(2)</sup>Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

In this study, the binary vector pCB-gusplus carrying *nptII* and *gus* - *intron* genes as selectable and reportable markers was used to optimize *Agrobacterium*-mediated gene transformation protocol of four Vietnam watermelon lines. *Agrobacterium tumefaciens* CV58 harbouring pCB-gusplus in the concentration of OD<sub>600</sub> 0.6-0.8 was infected into 5-7 day cotyledons for 30 minutes and co-cultured for 3 days. The transformed leaf materials was cultured in the selectable medium containing MS salts and vitamins supplemented with 1.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IBA, 200 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime. Regenerated shoots was rooted in MS medium added with 0.2 mg/l IBA, 100 mg/l kanamycin and 250 mg/l cefotaxime. There was a significant difference in the transformation frequency among watermelon lines. F1 TG939 line showed the transformation frequency of 1.87%, following F9 Tieulong - Thanglong of 1.85%, F1 Kinhkong and F9 Binhthuan lines showed the transformation frequency of 0%. The analysis of the obtained lines using GUS histochemical assay and PCR reaction with specific primers of *nptII* gene had confirmed the presence of *gus* gene into 5 transgenic lines.

*Keywords:* *Agrobacterium*, *Citrullus lanatus*, gene *gus*, genetic transformation, kanamycin.

Ngày nhận bài: 25-2-2012