

## QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO CÂY XOAN TA (*MELIA AZEDARACH* L.) BẰNG *AGROBACTERIUM* ĐẠT HIỆU SUẤT CAO

Bùi Văn Thắng<sup>1,2</sup>, Đỗ Xuân Đồng<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*chuhongha@ibt.ac.vn

**TÓM TẮT:** Quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) đạt hiệu suất cao thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được nghiên cứu hoàn chỉnh. Đoạn thân mầm của cây hạt gieo 12 ngày tuổi, tiền nuôi cấy 2 ngày trên môi trường cảm ứng MS bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA làm thể nhận gen. Thể nhận gen đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA101 mang vector nhị thể pBI121 chứa gen gus và nptII trong 48 giờ và cấy chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 150 mg/l kanamycin và 300 mg/l cefotaxime. Các chồi sống sót sau 2 lần cấy trên môi trường tái sinh chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường ra rễ MS bổ sung 0,3 mg/l IBA và 50 mg/l kanamycin. Chồi, cây chuyển gen được khẳng định bằng phương pháp nhuộm X-gluc và PCR. Trên đây là quy trình chuyển gen vào Xoan ta đạt hiệu suất chuyển gen cao (18,15%), quy trình có độ lặp lại cao, ổn định nên có thể ứng dụng chuyển thành công các gen đích vào cây Xoan ta để cải thiện giống.

*Từ khóa:* *Agrobacterium*, *Melia azedarach* L., cây Xoan ta, chuyển gen, tái sinh.

### MỞ ĐẦU

Cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Lào và Trung Quốc. Ở Việt Nam, cây này được trồng thành rừng hoặc phân tán ở hầu hết các tỉnh từ Bắc đến Nam. Đây là loài cây gỗ lớn, nhiều tác dụng: gỗ nhẹ, có vân thớ đẹp, khá bền và khó bị mối mọt, nên được dùng trong xây dựng, trang trí nội thất và điêu khắc, lá làm phân xanh, hạt ép lấy dầu. Loài cây này cũng có chất therapeutic và một số hợp chất limonoids [5, 6]. Vì vậy, cây Xoan ta được đánh giá là một trong những cây trồng quan trọng trong chiến lược phát triển lâm nghiệp ở Việt Nam. Xoan ta có mặt ở 6 trong 9 vùng sinh thái lâm nghiệp, trong đó vùng Trung tâm, vùng Đồng bằng Sông Hồng và vùng Nam Trung bộ Xoan ta đứng đầu trong danh mục các cây trồng được ưu tiên phát triển theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/03/2005 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

Với giá trị kinh tế của cây Xoan ta, việc ứng dụng công nghệ chuyển gen để cải thiện giống là cần thiết. Đã có nhiều công trình trong và ngoài nước nghiên cứu về tái sinh Xoan ta [1, 2, 10, 11, 12, 13, 15]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ tập trung vào việc tái sinh *in vitro* phục vụ nhân giống vô tính, chọn lọc biến dị. Số lượng công trình công bố về chuyển gen

vào cây Xoan ta còn rất ít. Trên thế giới mới chỉ có duy nhất một công trình công bố về chuyển gen GFP vào cây Xoan ta [8], ở Việt Nam có 3 công trình công bố về chuyển gen vào cây Xoan ta: chuyển gen 4Cl [14]; chuyển gen GA20 [2, 4], tuy nhiên, các quy trình chuyển gen này có hiệu suất chuyển gen còn thấp so với tiềm năng tái sinh hiệu suất cao của cây Xoan ta đã được báo cáo [3, 13]. Để nâng cao hiệu suất biến nạp gen vào cây Xoan ta thông qua *Agrobacterium tumefaciens*, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khảo sát từng nhân tố ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất biến nạp.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta đạt hiệu suất cao, đặc biệt quy trình có độ lặp lại cao, ổn định nên có thể áp dụng để chuyển thành công các gen đích vào cây Xoan ta.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu

Hạt Xoan ta được Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp cung cấp. Gieo hạt tạo cây mầm trong ống nghiệm theo phương pháp của Bùi Văn Thắng và nnk. (2007) [13], sử dụng thân mầm và lá mầm làm vật liệu chuyển gen.

Các chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404, C58, EHA101, EHA105 chứa vector chuyển gen pBI121 vùng T-DNA có gen *gus* và *nptII* được Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

### Phương pháp

#### Xác định nồng độ kanamycin chọn lọc

Đoạn thân mầm và mảnh lá mầm được cấy lên môi trường tái sinh MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin và kanamycin (0, 50, 100, 150, và 200 mg/l).

#### Nuôi khuẩn, nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy

Bốn chủng *A. tumefaciens* LBA4404, C58, EHA101, EHA105 chứa vector chuyển gen pBI121 vùng T-DNA có gen *gus* và *nptII*, được nuôi hoạt hóa trên môi trường LB lỏng có 100 mg/l rifamycin và 50 mg/l kanamycin, ở 28°C, lắc 200 vòng/phút, trong 5-7 giờ cho tới khi giá trị OD<sub>600</sub> = 0,5. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm để thu cặn tế bào và hòa tan trong dung dịch ½ MS lỏng bổ sung 200 µM acetosyringone để làm dung dịch vi khuẩn chuyển gen.

Đoạn thân mầm được tiên nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA để làm vật liệu chuyển gen. Đoạn thân mầm và mảnh lá mầm được ngâm trong dung dịch *A. tumefaciens* đã chuẩn bị ở trên trong 30 phút (lắc nhẹ). Sau đó, mẫu được thấm khô và cấy chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy MS bổ sung 200 µM acetosyringone, 0,5 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin, nuôi trong buồng tối, ở nhiệt độ 25°C, trong 24-96 giờ để vi khuẩn xâm nhiễm và chuyển gen sang tế bào thực vật.

Đồng nhất các nhân tố: tất cả môi trường nuôi cấy mô bổ sung 3% sucrose và 8 g/l agar. Thí nghiệm xác định loại vật liệu thích hợp để làm thể nhận gen, ảnh hưởng của thời gian tiên nuôi cấy đoạn thân mầm đến hiệu suất chuyển gen, xác định thời gian đồng nuôi cấy thích hợp sử dụng chủng *A. tumefaciens* C58.

#### Tái sinh, sàng lọc chồi, tạo cây chuyển gen hoàn chỉnh

Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được rửa sạch vi khuẩn bằng dung dịch 500 mg/l cefotaxime, thấm khô và cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi chọn lọc MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 150 mg/l

kanamycin và 300 mg/l cefotaxime, nuôi 3 tuần dưới đèn đèn để mẫu tái sinh chồi. Sau 4 tuần nuôi cấy, cắt các chồi tái sinh cấy chuyển sang môi trường chọn lọc mới và nuôi tiếp 4 tuần. Chọn các chồi có thân, lá xanh đậm và phần gốc có cảm ứng mô sẹo cấy chuyển lên môi trường ra rễ chọn lọc MS bổ sung 0,3 mg/l IBA, 50 mg/l kanamycin, nuôi 2-3 tuần dưới đèn đèn chồi chuyển gen ra rễ.

#### Kiểm tra mẫu biểu hiện gen tạm thời, chồi và cây chuyển gen

Mẫu được chuyển gen một tuần, chồi, cây ra rễ trên môi trường chọn lọc được kiểm tra sự biểu hiện GUS theo phương pháp của Jefferson et al. (1987) [7].

DNA tổng số được tách từ mẫu lá các dòng Xoan ta chuyển gen (dương tính với GUS). Sử dụng cặp mồi đặc hiệu F: 5'-TTC GCG TCGGCA TCC GCT CAG TGG CA-3' và R: 5'-GCG GAC GGG TAT CCG GTT CGT TGG CA-3' khuếch đại bằng DNA 530 bp của gen *gus*. Plasmid pBI121 mang gen *gus* dùng làm đối chứng dương, cây không chuyển gen làm đối chứng âm. Phản ứng PCR thể tích 25 µl gồm: 1X đệm; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTPs; 1 µM mỗi loại mồi F và R; 1 đơn vị *Taq* polymerase và 50 ng ADN khuôn. PCR theo chu trình nhiệt: 94°C/4 phút; 30 chu kỳ: 94°C/1 phút, 58°C/45 giây, 72°C/1 phút; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm bằng ethidium bromide, soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

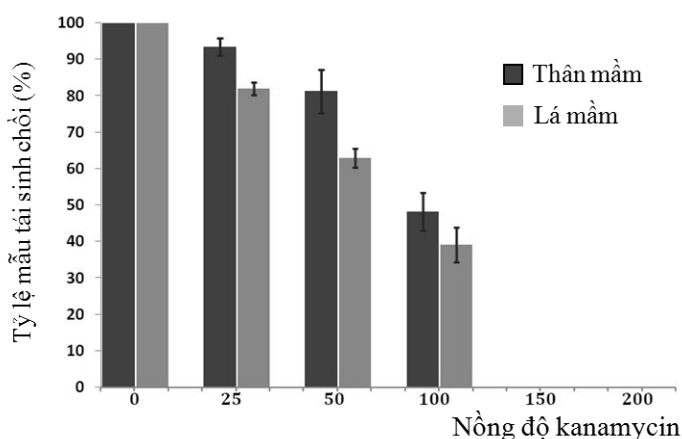
### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Xác định nồng độ kanamycin thích hợp cho chọn lọc chồi Xoan ta chuyển gen

Mỗi loài cây có khả năng miễn cảm với nồng độ kanamycin khác nhau, vì vậy, nếu nuôi mẫu trên môi trường có nồng độ kanamycin quá cao sẽ làm mẫu bị chết, hoặc bị ức chế không tái sinh. Ngược lại, nuôi trên môi trường có nồng độ kháng sinh thấp sẽ khó chọn lọc được chồi chuyển gen. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm khả năng miễn cảm của đoạn thân và mảnh lá mầm trên môi trường tái sinh MS bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin và kanamycin với nồng độ khác nhau (0, 25, 50, 100, 150 và 200 mg/l). Kết quả thu được cho thấy, ở nồng độ

kanamycin 25, 50 và 100 mg/l môi trường có tỉ lệ mẫu tái sinh chồi tương ứng với đoạn thân là 93,5; 81,2 và 48,2%, với mảnh lá là 81,9; 62,9 và 39,1%. Nồng độ kanamycin  $\geq 150$  mg/l môi trường hầu hết các mẫu cây cả đoạn thân và mảnh lá mầm không còn khả năng tái sinh chồi (hình 1). Từ kết quả này cho thấy Xoan ta là một trong loài cây có khả năng kháng cao với

kanamycin, ở nồng độ 100 mg/l kanamycin mẫu Xoan ta không chuyển gen vẫn tái sinh (39,1%), trong khi đó, đối với các loài cây gỗ khác mẫu bị chết và mất hoàn toàn khả năng tái sinh [8]. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng sử dụng nồng độ 150 mg/l kanamycin là thích hợp cho chọn lọc chồi Xoan ta chuyển gen.

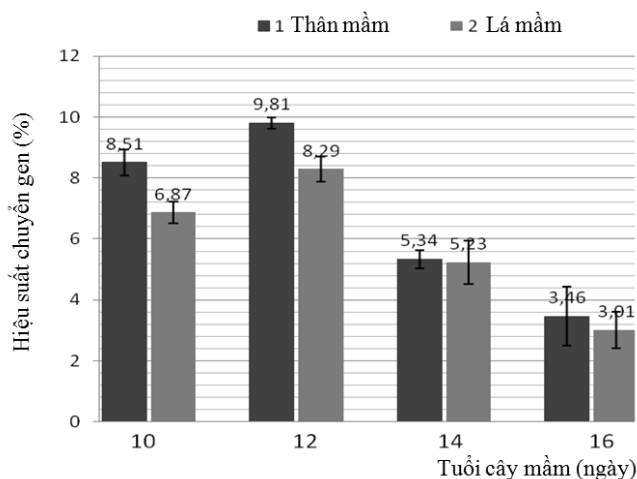


Hình 1. Khả năng tái sinh chồi Xoan ta trên môi trường có kanamycin (0-200 mg/l) sau 4 tuần nuôi cấy

#### Xác định loại vật liệu thích hợp làm thể nhận gen

Ở độ tuổi cây mầm khác nhau, đoạn thân mầm có hiệu suất chuyển gen cao hơn so với mảnh lá mầm. Thân mầm và lá mầm của cây mầm 12 ngày tuổi có hiệu suất chuyển gen cao

nhất là 9,81 % (thân mầm) và 8,29% (lá mầm). Thân mầm và lá mầm của cây mầm 14 và 16 ngày tuổi có hiệu suất chuyển gen giảm mạnh (hình 2). Từ kết quả này gợi ý sử dụng đoạn thân mầm của cây hạt Xoan ta 12 ngày tuổi là tốt nhất để làm thể nhận gen.



Hình 2. Ảnh hưởng của loại vật liệu đến hiệu suất chuyển gen

**Ảnh hưởng của thời gian tiên nuôi cấy đoạn thân mầm đến hiệu suất chuyển gen**

Để nâng cao hiệu quả chuyển gen vào cây Xoan ta, chúng tôi tiến hành chuyển gen vào đoạn thân mầm không tiên nuôi cấy và tiên nuôi cấy 1, 2 và 3 ngày. Kết quả thu được cho thấy,

sử dụng đoạn thân mầm tiên nuôi cấy 1-3 ngày làm thể nhận gen có hiệu suất chuyển gen cao hơn so với không tiên nuôi cấy. Đoạn thân mầm tiên nuôi cấy 2 ngày sử dụng làm thể nhận gen cho hiệu suất chuyển gen cao nhất là 13,26% (bảng 2).

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của thời gian tiên nuôi cấy thể nhận gen đến hiệu suất chuyển gen

Thời gian tiên nuôi cấy (ngày)	Thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số chồi chuyển gen (GUS/PCR+)	Hiệu suất chuyển gen (%)	Trung bình (%) $\pm$ SD
0	1	50	5	10,00	
	2	40	4	10,00	9,87 $\pm$ 0,22
	3	52	5	9,62	
1	1	55	6	10,91	
	2	67	7	10,45	11,09 $\pm$ 0,74
	3	84	10	11,90	
2	1	45	6	13,33	
	2	43	6	13,95	13,26 $\pm$ 0,73
	3	64	8	12,50	
3	1	45	5	11,11	
	2	58	6	10,34	10,92 $\pm$ 0,50
	3	62	7	11,29	

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu suất chuyển gen

Thời gian đồng nuôi cấy (giờ)	Thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số chồi chuyển gen (GUS/PCR+)	Hiệu suất chuyển gen (%)	Trung bình (%) $\pm$ SD
24	1	22	2	9,09	
	2	24	3	12,50	9,6 $\pm$ 2,35
	3	25	2	8,00	
48	1	20	2	10,00	
	2	26	4	15,38	13,79 $\pm$ 3,30
	3	25	4	16,00	
72	1	25	3	12,00	
	2	22	2	9,09	10,36 $\pm$ 1,49
	3	20	2	10,00	
96	1	25	2	8,00	
	2	23	1	4,35	6,59 $\pm$ 1,96
	3	27	2	7,41	

**Xác định thời gian đồng nuôi cấy thích hợp**

Đồng nuôi cấy là thời gian để *A. tumefaciens* chuyển gen (T-DNA) sang tế bào của thể nhận. Vì vậy, việc xác định được

khoảng thời gian đồng nuôi cấy thích hợp sẽ nâng cao hiệu suất chuyển gen. Thực nghiệm với 4 công thức về thời gian đồng nuôi cấy 24, 48, 72 và 96 giờ. Kết quả chuyển gen thu được

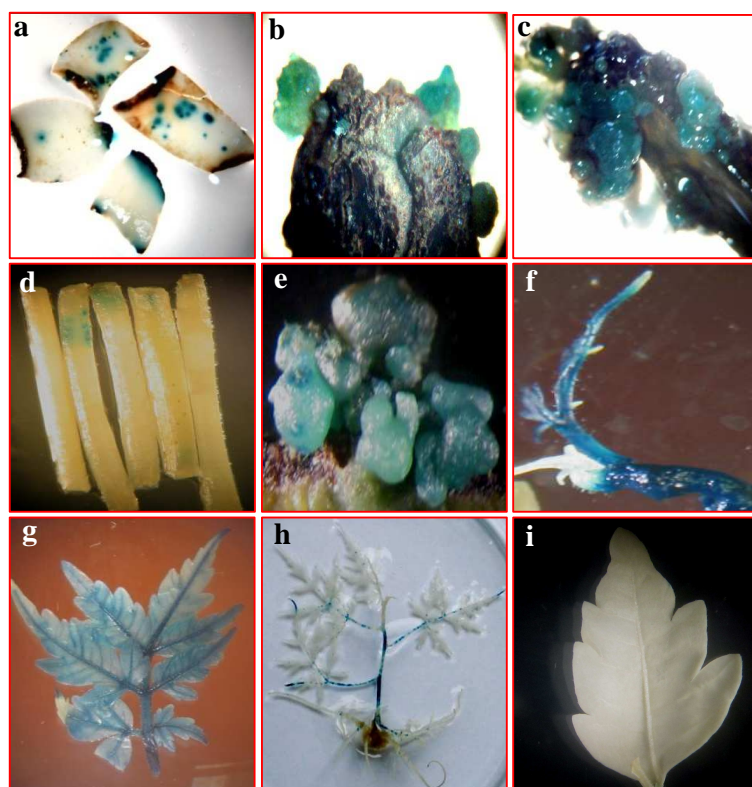
ở công thức đồng nuôi cấy trong 48 giờ có hiệu suất chuyển gen cao nhất là 13,79% so với các công thức khác. Khi tăng thời gian đồng nuôi cấy lên 72 giờ và 96 giờ hiệu suất chuyển gen giảm xuống 10,36% và 6,59% (bảng 3). Kết quả này chỉ ra rằng, đối với thể nhận gen là đoạn thân mầm Xoan ta, thời gian đồng nuôi cấy thích hợp là 48 giờ.

#### Ảnh hưởng của chủng *A. tumefaciens* đến hiệu suất chuyển gen vào Xoan ta

Để nâng cao hiệu suất chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*, đối với mỗi loài thực vật cần xác định được chủng *A. tumefaciens* thích hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 4 chủng *A. tumefaciens* (LBA4044, C58, EHA101 và EHA 105) để khảo sát chuyển gen *gus* và *nptII* vào Xoan ta. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, 3 chủng LBA4044, EHA101 và EHA105 cho hiệu suất chuyển gen vào Xoan ta cao hơn so với chủng C58 (bảng 4). Chủng

EHA101 có hiệu suất chuyển gen vào Xoan ta đạt cao nhất là 18,15%, cao hơn rất nhiều so với các báo cáo đã công bố về chuyển gen 4Cl, GA20 vào Xoan ta [2, 4, 14].

Ngo Van Thanh et al. (2010) [14], Nghiên cứu chuyển gen 4Cl vào Xoan ta sử dụng chủng *A. tumefaciens* C58 chứa vector pPTN289-4Cl có gen chọn lọc là gen kháng PPT (gen bar) nên chỉ thu được 2 dòng cây chuyển gen. Tương tự, Hồ Văn Giảng và nnk. (2011) [4], chuyển gen GA20 vào Xoan ta sử dụng chủng *A. tumefaciens* C58 chứa vector pBI121-GA20 có gen chọn lọc là gen kháng kanamycin (gen *nptII*), chọn lọc chồi chuyển gen ở nồng độ 100 mg/l kanamycin. Kết quả chỉ thu được 5 dòng cây chuyển gen/3000 mẫu thí nghiệm. Hiệu suất chuyển gen vào Xoan ta thấp có thể nguyên nhân là do các tác giả chưa tối ưu hóa được chất chọn lọc, nồng độ chất chọn lọc, tuổi cây mầm, thể nhận gen, môi trường và điều kiện tái sinh chồi chuyển gen.



Hình 3. Xoan ta chuyển gen biểu hiện GUS ở các giai đoạn khác nhau  
a, d: đoạn thân, mảnh lá mầm biểu hiện GUS tạm thời; b, c, e: mô sẹo;  
f: chồi; g, h: lá, cây hoàn chỉnh biểu hiện GUS; i: đối chứng âm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chủng *Agrobacterium tumefaciens* đến hiệu suất chuyển gen

Chủng	Thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số chồi chuyển gen (GUS/PCR+)	Hiệu suất chuyển gen (%)	Trung bình (%) $\pm$ SD
LBA4044	1	62	10	16,13	15,93 $\pm$ 0,56
	2	55	9	16,36	
	3	85	13	15,29	
C58	1	62	9	14,52	13,77 $\pm$ 1,10
	2	70	10	14,29	
	3	56	7	12,50	
EHA101	1	45	8	17,78	18,15 $\pm$ 1,70
	2	78	13	16,67	
	3	50	10	20,00	
EHA105	1	68	11	16,18	17,72 $\pm$ 1,48
	2	84	15	17,86	
	3	68	13	19,12	

### KẾT LUẬN

Quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta thông qua *Agrobacterium tumefaciens* đạt hiệu suất cao đã được hoàn thiện. Hiệu suất chuyển gen đạt 18,15% khi sử dụng đoạn thân cây mầm 12 ngày tuổi, tiền nuôi cấy 2 ngày làm thể nhận gen, chuyển gen bằng chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA101, đồng nuôi cấy 48 giờ và chọn lọc chồi chuyển gen trên môi trường tái sinh bổ sung 150 mg/l kanamycin. Quy trình đã được tối ưu, có độ lặp lại cao và ổn định. So với các loài cây lâm nghiệp khác, Xoan ta là loài cây dễ tiếp nhận gen ngoại lai, vì vậy, đây là một mô hình triển vọng để nghiên cứu chuyển gen.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad Z., Zaidi N., Shah F. H., 1990. Micropropagation of *Melia azedarach* from mature tissue. Pak. J. Bot., 22: 172-178.
- Đỗ Xuân Đồng, Bùi Văn Thắng, Hồ Văn Giảng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, 2011. Nghiên cứu chuyển gen mã hóa gibberellin 20-oxidase vào cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) bằng *Agrobacterium tumefaciens*. Tạp chí Công nghệ sinh học, 9 (2): 217-222.
- Đỗ Xuân Đồng, Bùi Văn Thắng, Hồ Văn Giảng, Nông Văn Hải, Chu Hoàng Hà, 2008. Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) thông qua phôi soma từ thân mầm phục vụ chuyển gen. Tạp chí Công nghệ sinh học, 2: 227-232.
- Hồ Văn Giảng, Hà Văn Huân, Vũ Kim Dung, Chu Hoàng Hà, Bùi Văn Thắng, 2011. Tạo giống Xoan ta (*Melia azedarach* L.) sinh trưởng nhanh bằng kỹ thuật chuyển gen. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT : 11-14.
- Huang R. C., Tadera K., Yagi F., Minami Y., Okamura H., Iwagawa T., Nakatani M., 1996. Limonoids from *Melia azedarach*. Phytochemistry 43:581-583.
- Itokawa H., Qiao Z., Hirobe C., Takeya K., 1995. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 43:1171-1175.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J., 6: 3901-3907.
- Nirsatmanto A., Gyokusen K., 2007. Genetic transformation of *Melia azedarach* L., using *Agrobacterium* mediated transformation. Journal of Forestry Research, 4(1): 1-8.
- Prakash M. G., Gurumurthi K., 2009. Genetic transformation and regeneration of

- transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Using *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 45: 429-434.
10. Sharry S., Teixeira da Silva J., 2006a. Effective organogenesis, somatic embryogenesis and salt tolerance induction *in vitro* in the persian Lilac tree (*Melia azedarach* L.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 2: 318-324.
  11. Sharry S., Cabrera Ponce J. L., Estrelia L. H., Rangel Cano R. M., Lede S., Abedini W., 2006b. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of Chinaberry - tree *Meia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): 188-194.
  12. Thakur R., Rao P., Bapat V., 1998. *In vitro* plant regeneration in *Melia azedarach* L. *Plant Cell Reports*, 18: 127-131.
  13. Bùi Văn Thắng, Hà Văn Huân, Nguyễn Văn Việt, Hồ Văn Giảng, 2007. Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) phục vụ cho chuyển gen. Hội nghị Khoa học toàn quốc về Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 815-819.
  14. Ngo Van Thanh, Jiang Xiangning, Ha Van Huan, Nguyen Thi Hau, Ho Van Giang, 2010. Vector construction and transformation of 4Cl1 gene into Chinaberrytree (*Melia azedarach* L.). *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, 26: 205-210.
  15. Vila S., Gonzalez A., Rey H., Mroginski L., 2005. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segment of *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*) seedlings. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41: 746-751.

### **THE HIGH FREQUENCY OF TRANSFORMATION PROCEDURE FOR EXPRESSION OF GUS GENE IN CHINABERRY TREE (*MELIA AZEDARACH* L.) USING *AGROBACTERIUM***

**Bui Van Thang<sup>1,2</sup>, Do Xuan Dong<sup>2</sup>, Le Van Son<sup>2</sup>, Chu Hoang Ha<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>College of Forestry Biotechnohogy, Vietnam Forestry University

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

#### **SUMMARY**

An efficient transformation procedure for expression of *gus* gene was developed for *Melia azadarach* L. using hypocotyl explants. Hypocotyl explants from 12 day seedling precultured 2 days on induction media that containing 1.0 mg/l BAP, and 0.2 mg/l NAA. These samples were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 harboring the binary vector pBI121 containing the *gus* and *neomycin phosphotransferase II* genes for 48 hours and transferred to selective regeneration media containing 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l kinetin, 150 mg/l kanamycin, and 300 mg/l cefotaxime. After two passages on the selective regeneration media, the kanamycin-resistance shoots were transferred to the rooting media supplemented with 0.3 mg/l IBA, and 50 mg/l kanamycin. A strong  $\beta$ -glucuronidase activity was detected in the transformed plants by histochemical assay. Integration of T-DNA into the nuclear genome of transgenic plants was confirmed by polymerase chain reaction. This procedure geve effective transformation of *Melia azadarach* L. with 18.15% transformation frequency. The procedure proved to be stable and could be applied for transferring the useful genes into *Melia azadarach* L..

*Keywords:* *Agrobacterium*, *Melia azadarach*, chinaberry tree, genetic transformation, regeneration.

*Ngày nhận bài:* 10-10-2012