

PHÁT TRIỂN HỆ THỐNG CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ *IN VITRO* TRÊN MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN VÀ CHỈNH SỬA HỆ GEN

Lê Thị Như Thảo^{1,2,3}, Nguyễn Hồng Nhung¹, Lê Quang Huy¹, Bùi Phương Thảo¹, Lê Thu Ngọc¹, Phạm Bích Ngọc^{1,2}, Chu Hoàng Hà^{1,2}, Đỗ Tiến Phát^{1,2,✉}

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

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Cao đẳng Nông nghiệp Nam Bộ

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: dtphat@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 20.8.2020

Ngày nhận đăng: 16.10.2020

TÓM TẮT

Hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu về chức năng gen, biểu hiện gen và chỉnh sửa hệ gen trên nhiều loài thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển, hoàn thiện và đánh giá hoạt động của hệ thống chuyển gen cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trên một số giống đậu tương của Việt Nam và thế giới. Khả năng tạo rễ tơ *in vitro* và hiệu quả chuyển gen thông qua cảm ứng tạo rễ tơ có sự biến động phụ thuộc vào giống đậu tương cũng như cấu trúc gen chuyển. Tỷ lệ tạo rễ tơ của các giống đậu tương dao động từ 61,67% đến 100% sau 5 ngày trên môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ rễ tơ mang gen chuyển ở cấu trúc *gfp* dao động từ 43,8% đến 79,8%, trong khi với cấu trúc *gus*, tỷ lệ này đạt từ 38,07% tới 72,33%. Trong đó, giống đậu tương ĐT26 cho thấy khả năng thu nhận và biểu hiện gen chuyển tốt nhất với cả hai cấu trúc gen chỉ thị được nghiên cứu. Hệ thống cảm ứng rễ tơ này được ứng dụng trong việc tạo đột biến định hướng thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 trên hai gen *G03* và *G19* của giống đậu tương ĐT26. Đột biến định hướng trên vùng gen quan tâm được khẳng định thông qua các băng vạch mới khi so sánh với dòng rễ tơ không chuyển gen trong phân tích PAGE. Kết quả giải trình tự vùng gen quan tâm ghi nhận các đột biến mất đoạn dao động từ -3 bp tới -25 bp trên cả hai gen quan tâm. Kết quả này là cơ sở quan trọng trong việc nghiên cứu chức năng gen và chỉnh sửa gen mục tiêu trên cây đậu tương ở nước ta trong tương lai.

Từ khóa: *Agrobacterium rhizogenes*, CRISPR/Cas9, đậu tương, *gus*, rễ tơ

MỞ ĐẦU

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr.) hay đậu nành thuộc giống cây họ Đậu (Fabaceae), là cây trồng có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Các nhà nghiên cứu gọi đậu tương là “thịt không xương” thay thế được cho nguồn đạm động vật. Hàm lượng protein có trong đậu tương cao nhất trong các loại hạt thực vật (35–50%), cao gấp 2 lần hàm lượng protein có trong cá, thịt nhưng lại dễ tiêu hóa và không có thành phần tạo cholesterol. Cây

đậu tương được trồng ưu tiên ở khắp các châu lục với mục tiêu giải quyết nạn đói và thiếu protein, bổ sung hàm lượng dinh dưỡng quan trọng cho người và làm thức ăn cho gia súc (Nguyễn Mạnh Chinh, Nguyễn Đăng Nghĩa, 2007). Mỹ, Brazil, Argentina, Trung Quốc và Ấn Độ là các quốc gia có sản lượng đậu tương cao, chiếm 90% tổng sản lượng đậu tương trên thế giới. Sản lượng đậu tương của nước ta xếp vào nhóm thấp do chất lượng giống chưa cao và ảnh hưởng nặng nề của sâu bệnh hại (The American Soybean

Association, 2019). Do vậy, việc cải tạo và phát triển các giống đậu tương nhằm đáp ứng nhu cầu mở rộng diện tích, nâng cao năng suất chất lượng đang được các nhà nghiên cứu và chọn giống tập trung quan tâm trong những năm gần đây.

Ứng dụng công nghệ sinh học trong việc nghiên cứu cải tạo giống cây trồng đã mang lại những thành công đáng kể trên nhiều đối tượng khác nhau trong đó có cây đậu tương (Rafalski *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2008, Nguyễn Văn Mạnh *et al.*, 2016). Sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã tạo ra các giống đậu tương mới mang tính trạng tốt như: kháng thuốc diệt cỏ, kháng sâu bệnh hại, kháng điều kiện khắc nghiệt của môi trường (hạn hán, ngập úng, chua-phèn), tăng năng suất, tăng chất lượng hạt... (Hinchee *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1999; Olhoft *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006). Gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 đã được phát triển với nhiều ưu việt và cho thấy tiềm năng to lớn trong chọn tạo giống cây trồng (Podevin *et al.*, 2013; Korotkova *et al.*, 2019). Trên cây đậu tương, công nghệ này đã cho thấy những triển vọng và thành công bước đầu với một số giống đậu tương nhất định (Cai *et al.*, 2015; Jacobs *et al.*, 2015; Kanazashi *et al.*, 2018, Do *et al.*, 2019). Phát triển và ứng dụng công nghệ này sẽ mở ra tiềm năng to lớn trong nghiên cứu cải tạo các giống đậu tương Việt Nam.

Bước quan trọng hàng đầu quyết định sự thành công của phương pháp chuyển gen cũng như chỉnh sửa hệ gen trên thực vật là việc kiểm tra hoạt động của hệ thống vector chuyển gen và cấu trúc chỉnh sửa hệ gen (Gelvin *et al.*, 2003). Tuy nhiên, đậu tương là cây trồng có hiệu suất chuyển gen rất thấp dẫn tới chi phí lớn để đánh giá hiệu quả của một hệ thống chỉnh sửa gen (Li *et al.*, 2015). Do vậy, cần một phương pháp nhanh và hiệu quả hơn để đánh giá hoạt động của các cấu trúc chuyển gen trên loại cây này. Một số nghiên cứu trước đây đã thành công trong việc sử dụng hệ thống cảm ứng tạo rết tơ để kiểm tra hoạt động của cấu trúc chuyển gen cũng như hiệu quả chỉnh sửa hệ gen ở đậu tương. Các nghiên cứu này cũng khẳng định khả năng cảm ứng tạo rết tơ cũng như hiệu suất chuyển gen thông qua rết tơ

phụ thuộc rất lớn vào giống đậu tương sử dụng (Cao *et al.*, 2009; Keyes *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2011; Jacob *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018). Mặc dù vậy, hướng nghiên cứu này vẫn chưa được thực hiện trên các giống đậu tương ở Việt Nam. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã ứng dụng thành công hệ thống chuyển gen cảm ứng tạo rết tơ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* trong điều kiện *in vivo* để kiểm tra hoạt động của cấu trúc biểu hiện gen và chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trên một số giống đậu tương Việt Nam (Nhưng *et al.*, 2019). Tuy nhiên, với phương pháp *in vivo* việc sử dụng môi trường để chọn lọc các rết chuyển gen không thể áp dụng. Ngoài ra, việc duy trì và nhân nhanh sinh khối các dòng rết tơ thông qua hệ thống *in vivo* phục vụ các phân tích tiếp theo gặp nhiều hạn chế.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục tiến hành nghiên cứu thiết lập và phát triển hệ thống cảm ứng rết tơ *in vitro*, sử dụng thành công hệ thống này trong đánh giá biểu hiện gen và hoạt động của các cấu trúc chuyển gen, chỉnh sửa gen trên một số giống đậu tương làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống đậu tương ở Việt Nam trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Bốn giống đậu tương ĐT22, ĐT26, Williams 82 (WL82), Maverick (Mr) được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ – Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm – Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Vector pZY102 mang gen chỉ thị *gus* và gen chọn lọc thuốc trừ cỏ *bar* (pZY102/*gus*), và vector pFGC5941 mang gen chỉ thị *gfp* và gen chọn lọc thuốc trừ cỏ *bar* (pFGC/*gfp*) nằm trong vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 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.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình được phát triển dựa trên phương pháp của Chen và đồng tác giả (2018) có cải tiến với thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy rễ tơ đậu tương.

Tên môi trường	Thành phần
GCM (Gieo hạt)	MS (Murashige and Skoog, 1962); 20 g/L sucrose; 3g/L phytagel, pH 5,6
Nuôi cấy khuẩn lạc	YEP (Yeast Extract Peptone); 12 g/L Bacto agar; kháng sinh (streptomycine, spectinomycine và kanamycin nồng độ (250-500 mg/L) tùy thời điểm, pH 7,0
Lây nhiễm	½ MS; 20 g/L sucrose, pH 5,6
ICM (Nuôi cấy phát sinh rễ tơ)	MS; 30 g/L sucrose; 3,0 g/L phytagel; kháng sinh cefotaxime nồng độ (250-500 mg/L), pH 5,6
Chọn lọc rễ tơ	MS; 30 g/L sucrose; 3,0 g/L phytagel; kháng sinh cefotaxime nồng độ (250-500 mg/L); glufosinate (1-3 mg/L)

Chuẩn bị nguyên liệu biến nạp

Hạt đậu tương được chọn dùng làm nguyên liệu biến nạp là những hạt to, tròn đều, vỏ hạt đồng màu, nhẵn, không bị tổn thương; được đặt trong đĩa petri riêng cho từng giống. Các đĩa hạt được mở và đặt trong bình hút ẩm bằng thủy tinh trong tủ hút an toàn sinh học để được khử trùng bằng khí Clo (tạo thành từ 100 mL natri hypoclorit 10% và 4 mL HCl 12N), đóng nhanh nắp bình và niêm phong bằng parafilm ngay sau đó. Hạt giống được khử trùng trong thời gian từ 16-20 h tùy theo giống để đảm bảo độ nảy mầm cho hạt.

Đĩa hạt sau khi khử trùng sẽ được đóng nắp và chuyển vào tủ cấy vô trùng. Hạt được gieo với số lượng 5 hạt cho 1 đĩa chứa 20 mL môi trường GCM, điều kiện nuôi cấy 26-28°C, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày. Lá mầm được tách từ cây mầm 3 ngày tuổi sẽ được dùng nguyên liệu cho quá trình biến nạp.

Biến nạp tạo rễ tơ

Chuẩn bị khuẩn và môi trường lây nhiễm: Khuẩn gốc lưu trữ trong glycerol, ở -80°C được cấy trên môi trường tạo khuẩn lạc trong 2-3 ngày ở điều kiện tối, nhiệt độ 28°C. Tiếp theo, các khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy huyền phù vi khuẩn trong điều kiện lắc 250 vòng/phút, nhiệt độ 28°C, qua đêm. Dịch nuôi khuẩn được ly tâm, thu sinh khối và hòa loãng về mật độ vi khuẩn OD₆₆₀ đạt mức 0,6 trong môi trường lây nhiễm để tạo huyền phù vi khuẩn dùng cho biến nạp.

Lây nhiễm: Sau 3 ngày gieo hạt thân mầm và cuống lá được loại bỏ. Lá mầm được tách ra và gây tổn thương bằng dao cấy tại vị trí nốt lá mầm để làm nguyên liệu chuyển nạp. Tiếp đến, mẫu được ngâm trong huyền phù vi khuẩn trong 30 phút. Sau lây nhiễm, mẫu được đồng nuôi cấy trên bề mặt giấy thấm ẩm trong đĩa petri 5 ngày trong điều kiện sáng hoàn toàn ở 24-26°C.

Cảm ứng tạo rễ tơ và kiểm tra biểu hiện gen chỉ thị

Mảnh lá mầm sau khi đồng nuôi cấy sẽ được rửa khuẩn bằng dung dịch nước cất bổ sung cefotaxime nồng độ 500 mg/L và chuyển lên môi trường ICM cảm ứng tạo rễ tơ trong 5 ngày, điều kiện 26°C, sáng hoàn toàn. Rễ tơ đậu tương có chiều dài từ 1,5-2 cm được cấy chuyển trên môi trường chọn lọc rễ tơ có chứa glufosinate 3,0 mg/L. Hệ rễ phát triển trên môi trường chọn lọc được thu thập và đánh giá biểu hiện của gen chuyển.

Rễ tơ được hình thành với cấu trúc mang gen *gfp* được soi trực tiếp bằng kính hiển vi huỳnh quang, đoạn rễ tơ chứa cấu trúc chuyển gen sẽ phát sáng, độ phát sáng tùy thuộc vào biểu hiện của gen *gfp*. Đối với hệ rễ tơ hình thành từ cấu trúc mang gen chỉ thị *gus* sẽ được ngâm trong dung dịch X-Gluc và đặt trong tủ ổn nhiệt 37°C qua đêm theo phương pháp của Jefferson và đồng tác giả (1987). Biểu hiện màu GUS (xanh lam) và biểu hiện màu huỳnh quang sẽ được quan sát, thống kê và chụp ảnh lưu giữ.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển và hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

DNA hệ gen được tách chiết từ rễ tơ theo phương pháp CTAB của Doyle và đồng tác giả (1991). Cặp mồi Bar-F (5'-TACCATGAGCCCA GAACGACGCC-3') và Bar-R (5'-TACCATGAGCCCAGAACGACGCC-3') được sử dụng kiểm tra sự có mặt của gen kháng thuốc trừ cỏ; Cas9-F (5'-GCCCAAGAGGAACAGCGATAAGC-3') và Cas9-R (5'-CAGTTCGCCGGCAGAGCCAGC-3') được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa protein Cas9 trong cấu trúc chuyển gen. Gen đích được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi G03F/R (5'-TGACGGAAATGGCCATGCTCCTG-3'/5'-CCCCGTATATCTCCATGGCTTGG-3') và G19F/R (5'-TCTTGATTGAGTAAGGTGTGAG-3'/5'-GCGCCAGAGCATGGCAAGGAC-3'). Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% hoặc gel polyacrylamide 15% (đối với sản phẩm khuếch đại gen đích). Sản phẩm PCR của gen đích được tinh sạch và giải trình tự để kiểm tra sự xuất hiện của đột biến định hướng.

Xử lý số liệu

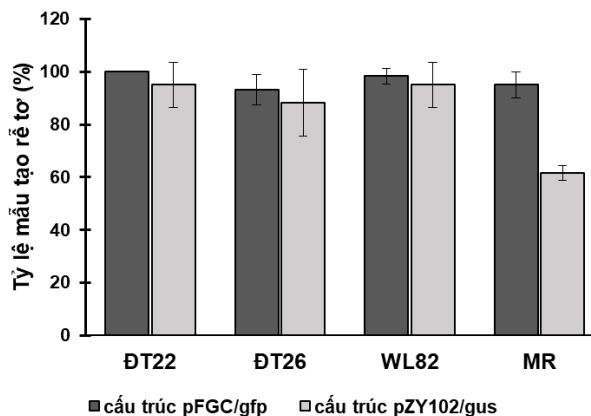
Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS (version 16.0).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

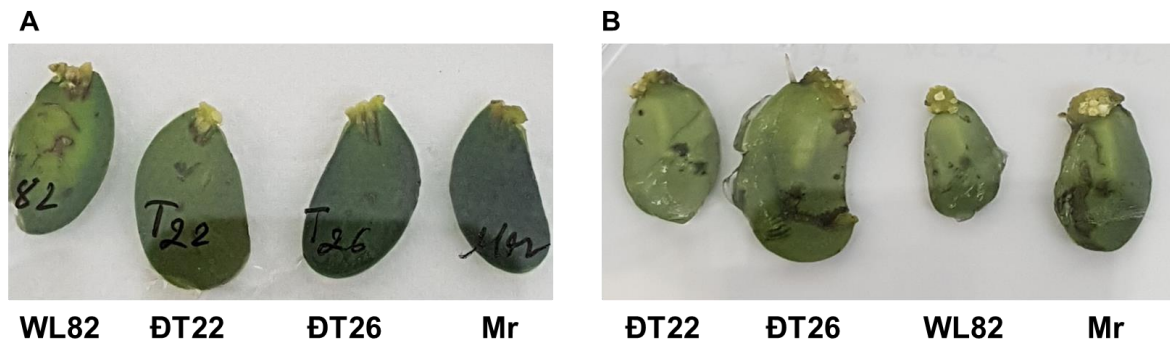
Hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ của các giống đậu tương

Nhiều nghiên cứu chuyển gen trên đậu tương đã chỉ ra rằng hiệu suất chuyển gen bằng vi khuẩn có liên quan chặt chẽ tới giống đậu tương được lựa chọn. Đồng thời quá trình nuôi cấy và biến nạp khuẩn đóng vai trò quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất biến nạp gen vào tế bào thực vật (Meurer *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chuyển gen tạo rễ tơ cho hai giống đậu tương có nguồn gốc ngoài nước là Williams 82 (WL82), Maverick (Mr) và hai giống đậu tương được trồng phổ biến tại Việt Nam là giống ĐT22, ĐT26 thông qua chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* K599 mang một trong hai cấu trúc chuyển gen (pZY102/*gus*, pFGC/*gfp*). Các mảnh lá mầm đậu tương được lây nhiễm dịch khuẩn trong 30 phút, thấm khô qua giấy và chuyển lên đĩa có chứa giấy ẩm để đồng nuôi cấy.

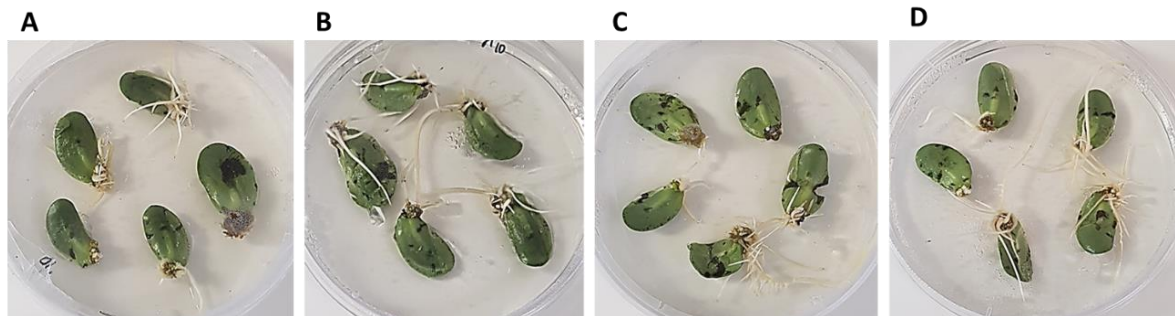
Kết quả ghi nhận về chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo rễ cho thấy: cả bốn giống đậu tương thí nghiệm được biến nạp khuẩn K599- pFGC/*gfp* có tỷ lệ mẫu phát sinh rễ tơ đạt mức cao (Hình 1). Khi quan sát mẫu tại vị trí tạo tổn thương, chúng tôi sớm nhận thấy mô sẹo cảm ứng sinh rễ xuất hiện ngay ở ngày thứ nhất trên môi trường cảm ứng tạo rễ (Hình 2).



Hình 1. Tỷ lệ tạo rễ tơ của các giống đậu tương chuyển gen.



Hình 2. Cảm ứng tạo rễ tơ trên các giống đậu tương nghiên cứu. (A) Mô sẹo hình thành tại vị trí tổn thương sau thời gian đồng nuôi cấy; (B) Rễ tơ cảm ứng trên môi trường tạo rễ



Hình 3. Phát triển rễ tơ đậu tương sau 5 ngày trên môi trường cảm ứng tạo rễ. (A) Rễ tơ của giống Mr; (B) Rễ tơ giống ĐT26; (C) Rễ tơ giống WL82; (D) Rễ tơ giống ĐT22

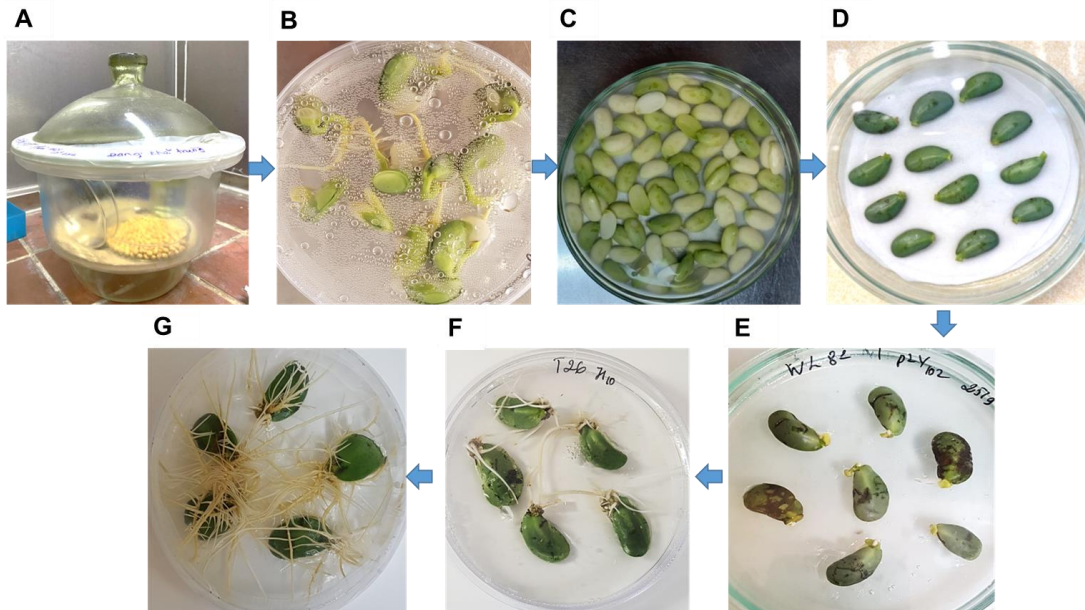
Sau 5 ngày cảm ứng tạo rễ, tỷ lệ tạo rễ tơ từ cấu trúc mang gen *gfp* trên giống ĐT22 đạt 100% và WL82 đạt 98,33%. Trong khi đó, tỷ lệ này của giống Mr là 95% và ĐT26 chỉ đạt 93,33%. Với cấu trúc mang gen chỉ thị *gus*, tỷ lệ tạo rễ tơ cao nhất của hai giống ĐT22 và WL82 khi biến nạp chỉ đạt mức 95%. Tỷ lệ này giảm xuống 88,33% với giống ĐT26 và 61,67% ở giống Mr. Kết quả này cho thấy giống đậu tương cũng như cấu trúc chuyển gen có ảnh hưởng trực tiếp tới tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ *in vitro* trong biến nạp sử dụng vi khuẩn *A. rhizogenes* (Hình 1, Hình 3).

Bên cạnh đó, số rễ tơ trung bình của hai giống đậu tương trong nước ĐT22 và ĐT26 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với hai giống nước ngoài WL82 và Mr. Sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo rễ tơ, giống ĐT22 và ĐT26 biến nạp với khuẩn mang cấu trúc pZY102/*gus* có số rễ tơ trung bình đạt lần lượt là

38,32 và 30,67 rễ/mẫu; và biến nạp với khuẩn mang cấu trúc pFGC/*gfp* số rễ tơ trung bình đạt là 35,13 rễ/mẫu và 31,03 rễ/mẫu. Trong khi đó, giống đậu tương Mr và WL82 có số rễ tơ trung bình tạo ra thấp khi biến nạp với cả hai chủng khuẩn thí nghiệm. Cụ thể, số rễ trung bình thấp nhất thu được ở giống WL82 với 20,3 rễ/mẫu khi biến nạp với cấu trúc pZY102/*gus* và 18,32 rễ/mẫu với cấu trúc pFGC/*gfp*.

Tổng hợp kết quả trên cho thấy giống đậu tương ĐT22 tỷ lệ ra rễ cũng như số rễ tơ trung bình được tạo ra từ quá trình cảm ứng chuyển ở cả hai cấu trúc pZY102/*gus* và pFGC/*gfp* đạt tỷ lệ cao nhất. Hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* thấp nhất là giống WL82.

Từ kết quả nghiên cứu trên trên, chúng tôi thiết lập và đưa ra quy trình cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* cho các giống đậu tương nghiên cứu với các bước chi tiết của quy trình ở Hình 4.



Hình 4. Quy trình cảm ứng tạo rễ *in vitro* trên đậu tương thông qua *A. rhizogenes* K599. (A) Khử trùng hạt bằng khí Clo, thời gian 16-20 giờ; (B) Hạt nảy mầm trên môi trường MS sau 04 ngày, trong điều kiện nhiệt độ 26°C, ánh sáng 8 giờ/ngày; (C) Lá mầm sau khi tạo tổn thương và nhiễm khuẩn; (D) Đồng nuôi cấy mẫu lá mầm trong 5 ngày trên giấy thấm ẩm; (E) Cảm ứng tạo rễ tơ đậu tương từ lá mầm; (F) Rễ tơ hình thành trên môi trường cảm ứng tạo rễ; (G) Rễ tơ phát triển sau 10 ngày trên môi trường.

Kiểm tra hoạt động của gen chuyển thông qua hệ thống rễ tơ

Phát triển của rễ tơ trên môi trường chọn lọc

Do các cấu trúc chuyển gen đều có chứa gen kháng thuốc trừ cỏ (gen *bar*), chúng tôi đánh giá biểu hiện của gen này trong rễ tơ đậu tương thông

qua nuôi cấy trên môi trường chọn lọc. Rễ tơ của bốn giống đậu tương được biến nạp gen với cấu trúc pZY102/*gus* và pFGC/*gfp* được cắt thành từng đoạn có chiều dài từ 1,5-2 cm và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc chứa hoạt chất chọn lọc glufosinate (1-3 mg/L). Tỷ lệ mẫu rễ tơ sống và có biểu hiện gen chỉ thị được thu thập sau 5 ngày nuôi cấy.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu sống và các mẫu biểu hiện gen chỉ thị trên môi trường chọn lọc.

Cấu trúc Giống	Tỷ lệ rễ sống trên môi trường chọn lọc (%)		Tỷ lệ rễ có biểu hiện gen chỉ thị (%)		Số rễ trung bình tạo thành (rễ/mẫu) sau 10 ngày nuôi cấy		Chiều dài trung bình của rễ trên môi trường chọn lọc (cm)	
	pZY102/ <i>gus</i>	pFGC/ <i>gfp</i>	<i>gus</i>	<i>gfp</i>	pZY102/ <i>gus</i>	pFGC/ <i>gfp</i>	pZY102/ <i>gus</i>	pFGC/ <i>gfp</i>
ĐT22	81,48 ^a	89,26 ^a	68,10 ^a	76,05 ^a	38,32 ^a	35,13 ^a	2,57 ^b	2,88
ĐT26	91,67 ^a	91,67 ^a	72,33 ^a	79,80 ^a	30,67 ^{ab}	31,03 ^{ab}	4,67 ^a	3,79
WL82	60,00 ^b	48,15 ^b	38,07 ^b	43,80 ^b	20,30 ^c	18,32 ^c	2,43 ^b	2,77
Mr	50,00 ^b	75,00 ^a	40,27 ^b	45,83 ^b	28,20 ^{bc}	26,06 ^b	2,39 ^b	2,15

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan 1 %, , mức 0,01)

Số liệu thống kê ở Bảng 2 cho thấy, rễ tơ của hai giống đậu tương ĐT22 và ĐT26 được biến nạp với cấu trúc pZY102/*gus* và pFGC/*gfp* có tỷ lệ sống cao trên môi trường chọn lọc chứa glufosinate và không có sự khác biệt thống kê so với hai giống còn lại. Trong đó, giống ĐT26 có tỷ lệ sống đạt 91,67% đối với cả với cấu trúc pZY102/*gus* và pFGC/*gfp*. Thêm vào đó, chiều dài trung bình của rễ tơ từ giống ĐT26 biến nạp cấu trúc chuyển gen pZY102/*gus* là 4,67 cm và với cấu trúc biến nạp pFGC/*gfp* là 3,79 cm. Như vậy, giống đậu tương của Việt Nam ĐT26 có rễ tơ tăng trưởng nhanh hơn giống Mr ở cả hai cấu trúc chuyển gen (2,39 cm với pZY102/*gus* và 2,15 cm với pFGC/*gfp*) (Bảng 2).

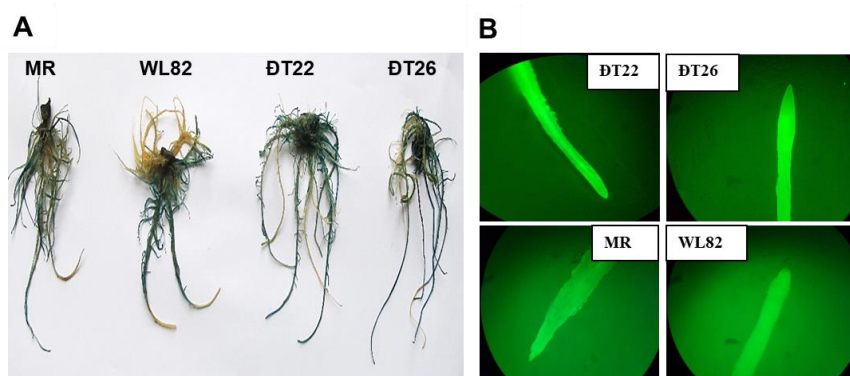
Bên cạnh đó, giống ĐT22 cũng cho kết quả sống tốt trên môi trường chọn lọc, đạt tỷ lệ sống 81,48% với cấu trúc pZY102/*gus* và 89,26% với cấu trúc pFGC/*gfp*. Tuy nhiên, chiều dài trung bình của rễ trên môi trường chọn lọc của giống ĐT22 biến nạp pZY102/*gus* và pFGC/*gfp* đều ngắn hơn so với giống ĐT26 (Bảng 2).

Hai giống đậu tương nhập nội WL82 và Mr có hệ rễ tơ phát triển kém trên môi trường nuôi cấy chứa glufosinate ở cả hai cấu trúc chuyển gen

pZY102/*gus* và pFGC/*gfp*. Cụ thể, tỷ lệ mẫu sống trên môi trường chọn lọc của giống WL82 mang cấu trúc pZY102/*gus* đạt 60% và ở giống Mr chỉ đạt 50%. Mặc dù ở cấu trúc chuyển gen pFGC/*gfp*, giống Mr cho tỷ lệ rễ sống đạt 75% nhưng vẫn thấp so với hai giống đậu tương của Việt Nam.

Biểu hiện của gen chỉ thị trong rễ tơ đậu tương

Kết quả phân tích tỷ lệ mẫu biểu hiện gen chỉ thị ở Bảng 2 cho thấy: tỷ lệ biểu hiện của gen *gus* đạt 72,33% với giống ĐT26. Tỷ lệ này ở các giống ĐT22, Mr, WL82 lần lượt đạt 68,1%, 40,27% và 38,07%. Quan sát mẫu rễ tơ nhuộm X-Gluc của hai giống cho thấy hầu hết các rễ tơ tạo được có biểu hiện màu xanh lam đặc trưng (Hình 5A). Kết quả kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang cũng khẳng định mức độ biểu hiện của gen *gfp* trong rễ tơ của các giống đậu tương nghiên cứu (Hình 5B). Cụ thể, tỷ lệ trung bình của các mẫu biểu hiện gen *gfp* có trong rễ tơ chuyển gen của giống ĐT26 đạt 79,8% cao nhất trong bốn giống đậu tương thí nghiệm, giống ĐT22 cũng đạt tỷ lệ cao 72,33%, kế đến là giống Mr 45,83%, thấp nhất là giống WL82 43,8%.



Hình 5. Biểu hiện gen chỉ thị trên rễ tơ cây đậu tương. (A) Kết quả nhuộm X-Gluc; (B) Kiểm tra biểu hiện của GFP dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp biến nạp *in vitro* có cải biến lần đầu tiên được áp dụng trên hai giống đậu tương có năng suất cao của Việt Nam (ĐT22 và ĐT26). Kết quả nghiên cứu cho thấy hai giống đậu tương ĐT22 và ĐT26 có khả năng tiếp nhận tốt cả hai cấu trúc

chuyển gen pZY102/*gus* và pFGC/*gfp*. Trong điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi, hiệu quả chuyển gen của hai giống đậu tương này thể hiện ưu việt hơn so với 2 giống đậu tương nước ngoài. Kết quả này là nền tảng để kiểm tra hiệu quả của các cấu trúc chuyển gen phục vụ nghiên

cứu nâng cao chất lượng các giống đậu tương trong nước.

Trong nghiên cứu của Chen và đồng tác giả (2018), lá mầm đậu tương 5 ngày tuổi bao gồm cuống lá dài 0,5 cm được sử dụng làm nguyên liệu biến nạp. Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ của các giống đậu tương trong nghiên cứu này đạt từ 90-99%. Tuy nhiên, hiệu suất chuyển gen chỉ đạt từ 30-60%. Tương tự như vậy, khi mầm 5 ngày tuổi được sử dụng trong biến nạp gen *gfp* trong công bố của Keyes và đồng tác giả (2009), tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ chỉ đạt 45%, trong đó, số rễ tơ mang và biểu hiện gen chuyển chỉ đạt khoảng 55%. Trong nghiên cứu này, lá mầm đậu tương 3 ngày tuổi được dùng làm nguyên liệu biến nạp gen, toàn bộ phần cuống lá mầm được loại bỏ trước khi tạo tổn thương và nhiễm khuẩn. Hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ và tỷ lệ chuyển gen có biến động giữa các giống đậu tương nghiên cứu (Bảng 2, Hình 1). Tỷ lệ chuyển gen cao nhất mà chúng tôi thu được là 79,8% với giống ĐT26 khi sử dụng cấu trúc mang gen *gfp*. Tỷ lệ cảm ứng tạo rễ tơ cũng đạt trên 90% với giống đậu tương này. Như vậy, cũng giống như các nghiên cứu trước đây, chúng tôi nhận thấy, yếu tố giống có ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu quả cảm ứng tạo rễ tơ và chuyển gen. Bên cạnh đó, tuổi lá mầm cũng như cách thức chuẩn bị mẫu lá mầm khi lây nhiễm khuẩn cũng đóng vai trò quan trọng tới hiệu quả chuyển gen thông qua rễ tơ trên đậu tương.

So với phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện *in vivo* ở một số giống đậu tương Việt Nam trước đây mà nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thực hiện (Nhưng *et al.*, 2019) thì phương pháp cảm ứng tạo rễ tơ trong điều kiện *in vitro* cho kết quả biểu hiện gen trong thời gian ngắn hơn giúp giảm thiểu thời gian và chi phí cho việc kiểm tra hoạt động của các cấu trúc chuyển gen. Ngoài ra, các rễ tơ mang gen chuyển có thể được chọn lọc tốt, duy trì và nhân lên trong điều kiện *in vitro* làm nguyên liệu cho các phân tích tiếp theo.

Hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trên rễ tơ đậu tương *in vitro*

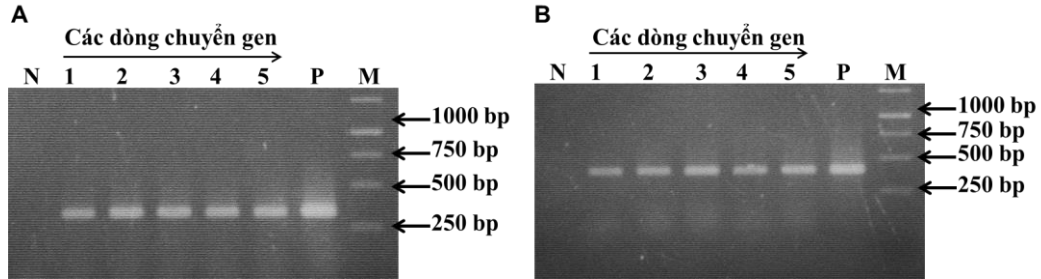
Chúng tôi tiến hành kiểm tra hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 với 2 trình tự RNA định hướng (sgRNA) nhằm tạo đột biến

trên hai gen (*G03* và *G19*) mã hóa enzyme *galactinol synthase* - enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp một số loại đường khó tiêu oligosaccharides họ raffinose (*raffinose family oligosaccharides* – RFOs) (Gangl *et al.*, 2015). Nguyên liệu sử dụng trong biến nạp là lá mầm 3 ngày tuổi của giống đậu tương ĐT26. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ghi nhận các dòng rễ tơ thu được mang gen chuyển thông qua việc khuếch đại gen bằng các cặp mồi đặc hiệu của gen *bar* và gen *Cas9* (Hình 6). Các đột biến xảy ra ở các dòng rễ tơ đậu tương chuyển gen bằng K599/*pFGC5941-Gal* được ghi nhận thông qua sự xuất hiện các băng sai lệch kích thước trên gel polyacrylamide 15% so với mẫu đối chứng không mang gen chuyển (WT). Kết quả điện di cho thấy, toàn bộ mẫu rễ tơ nghiên cứu xuất hiện các băng vạch DNA sai khác so với rễ tơ không chuyển gen ở cả hai gen quan tâm (Hình 7A). Để kiểm tra đặc điểm của các đột biến, chúng tôi lựa chọn ngẫu nhiên hai dòng rễ tơ số 3 và 4 để tiến hành giải trình tự vùng gen quan tâm (Hình 7). Kết quả cho thấy các đột biến mất đoạn khác nhau dao động từ -3 bp đến -25 bp trên vùng định hướng tạo đột biến của hai gen quan tâm (Hình 7B và 7C). Như vậy, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 được thiết kế trong nghiên cứu này đã hoạt động tốt với hệ thống cảm ứng rễ tơ trên giống đậu tương Việt Nam ĐT26 được nghiên cứu.

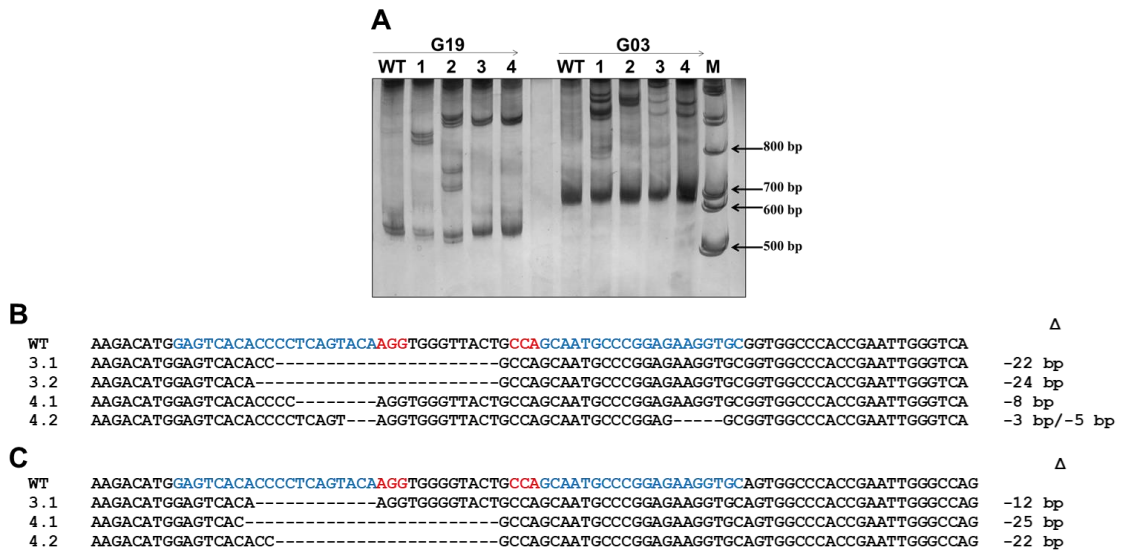
Hệ thống CRISPR/Cas9 đã được áp dụng thành công để tạo đột biến gen thông qua hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ trên đậu tương trong các nghiên cứu trước đây. Jacobs và đồng tác giả (2015) sử dụng hệ thống này để tạo đột biến gen ngoại lai (*gfp*) ở rễ tơ trên giống đậu tương Jack và ghi nhận tỷ lệ đột biến khoảng 95%. Trong khi đó, Cai và đồng tác giả (2015) đã thành công trong gây tạo đột biến hai gen trong hệ gen đậu tương với tỷ lệ chỉnh sửa gen dao động từ 1,3% tới 30%. Trong nghiên cứu này, cấu trúc CRISPR/Cas9 đã được thiết kế thành công để định hướng tạo đột biến trên hai gen *G03* và *G19* trong hệ gen đậu tương. Toàn bộ mẫu rễ tơ đã được kiểm tra đều xuất hiện băng vạch DNA sai khác khi phân tích đột biến thông qua điện di, khẳng định hiệu quả chỉnh sửa hệ gen rất cao thông qua cảm ứng tạo

rễ tơ trên giống đậu tương DT26. Đây là cơ sở để chúng tôi ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen

CRISPR/Cas9 trong nghiên cứu cải tạo giống đậu tương Việt Nam.



Hình 6. Sản phẩm khuếch đại bằng các cặp mồi đặc hiệu được điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TAE 1X. (A) Sự có mặt của gen *bar* trong các dòng rễ tơ; (B) Sự có mặt của gen mã hóa protein Cas9 trong các dòng rễ tơ; N: đối chứng âm (rễ tơ cảm ứng bởi chủng K599 không mang vector chuyển gen), 1-5: các dòng rễ tơ chuyển gen, P: đối chứng dương (plasmid pFGC5941-Gal), M: marker 1 kb ThermoScientific®.



Hình 7. Phân tích các đột biến ghi nhận trên các dòng rễ tơ đậu tương chuyển gen. (A) Sản phẩm khuếch đại gen *G03* và *G19* được chạy trên gel polyacrylamide 15% trong đệm TBE 1X theo phương pháp biến tính – hồi tính, các băng sai lệch kích thước chỉ xuất hiện ở các dòng chuyển gen (1-4) mà không xuất hiện ở cây không chuyển gen (WT) thể hiện các dòng rễ tơ mang đột biến, M: marker 1 kb ThermoScientific®; (B) Trình tự gen *G03* của các dòng rễ tơ chuyển gen tại vị trí chỉnh sửa đích, các đột biến mất đoạn nhỏ được ghi nhận nằm giữa hai gRNA; (C) Trình tự gen *G19* của các dòng rễ tơ chuyển gen tại vị trí chỉnh sửa đích.

KẾT LUẬN

Hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ *in vitro* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* đã được hoàn thiện trên một số giống đậu tương trong nước và nước ngoài với hiệu suất cao. Tỷ lệ mẫu tạo rễ tơ dao động từ 61,67% đến 100% với số rễ trung bình đạt từ 18,32 rễ/mẫu đến 38,32 rễ/mẫu. Các giống đậu tương Việt Nam cho thấy hiệu quả

chuyển gen tốt khi sử dụng hệ thống nuôi cấy rễ tơ *in vitro*. Biểu hiện của gen chuyển cũng như hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 đã được kiểm chứng hiệu quả với phương pháp nuôi cấy rễ tơ *in vitro*. Hệ thống cảm ứng tạo rễ tơ này sẽ được ứng dụng trong các nghiên cứu chức năng gen, thử nghiệm cấu trúc chuyển gen và chỉnh sửa hệ gen trên cây đậu tương ở nước ta.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi đề tài nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên và kỹ thuật (NAFOSTED), mã số: 106.03-2019.11

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cai Y, Chen L, Liu X, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W (2015) CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS One* 10(8): e0136064. doi.org/10.1371/journal.pone.0136064.
- Cao D, Hou W, Song S, Sun H, Wu C, Gao Y, Han T (2009) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 96: 45-52.
- Chen L, Cai Y, Liu X, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W (2018) Soybean hairy roots produced *in vitro* by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Crop J* 6(2): 162-171.
- Do PT, Nguyen CX, Bui HT, Tran LTN, Stacey G, Gillman JD, Zhang ZJ, Stacey MG (2019) Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biol* 19(1): 311. doi: 10.1186/s12870-019-1906-8.
- Doyle J (1991) *DNA Protocols for Plants*. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). Springer, Berlin, Heidelberg 57: 283-293.
- Gangl R, Behmüller R, Tenhaken R (2015) Molecular cloning of AtRS4, a seed specific multifunctional RFO synthase/galactosyl hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 6: 789. doi: 10.3389/fpls.2015.00789.
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1): 16-37.
- Hinchee MAW (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nat Biotech* 6(8): 915-922.
- Hwang TY, Nakamoto Y, Kono I, Enoki H, Funatsuki H, Kitamura K, Ishimoto M (2008) Genetic diversity of cultivated and wild soybeans including Japanese elite cultivars as revealed by length polymorphism of SSR markers. *Breed Sci* 58: 315-323.
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15: 16. doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Beva MW (1987) GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive DNA versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 16: 3901-3907.
- Jia Y, Yao X, Zhao M, Zhao Q, Du Y, Yu C, Xie F (2015) Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. *Int J Mol Sci* 16 (8): 18522-18543. doi: 10.3390/ijms160818522.
- Kanazashi Y, Hirose A, Takahashi I, Mikami M, Endo M, Hirose S, Toki S, Kaga A, Naito K, Ishimoto M, Abe J, Yamada T (2018) Simultaneous site-directed mutagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA. *Plant Cell Rep* 37:553-563.
- Keyes C, Subramanian S, Yu O (2009) Hairy root as a model system for undergraduate laboratory curriculum and research. *Bioscene* 35: 6-11
- Korotkova AM (2019) Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov J Genet Breed* 631(527): 224-234.
- Li ZS, Liu ZB, Xing AQ, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang LX, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169: 960-970.
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18: 180-186.
- Nguyễn Mạnh Chinh, Nguyễn Đăng Nghĩa (2007) *Trồng - chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh đậu nành, đậu xanh*. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 7-9.
- Nguyễn Văn Mạnh, Lê Đức Thảo, Phạm Thị Bảo Chung, Lê Thị Ánh Hồng, Lê Huy Hàm, (2016) Kết quả nghiên cứu chọn tạo giống đậu tương đen DT2008ĐB. *Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai*: 488-493.
- Nguyễn Hồng Nhung, Lê Quang Huy, Lê Thị Như Thảo, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát (2019) Thiết lập hệ thống cảm ứng rễ tơ trên đậu tương Việt Nam và sử dụng trong đánh giá hoạt động của cấu trúc chuyển gen. *Tuyển tập báo cáo toàn văn*

Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc. Hồ Chí Minh 2019: 483-487.

Olhoft PO, Somers DS (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20(8): 706-711.

Paz MM, Shou HX, Guo ZB, Zhang ZY, Banerjee AK, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136(2): 167-179.

Paz M, Martinez J, Kalvig A, Fonger T, Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 25: 206-223.

Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogue F, Casacuberta JM (2013) Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant

breeding. *Trends Biotechnol* 31: 375-383.

Rafalski JA, Tingey S (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 9(8): 275-280.

The American Soybean Association (2019). International: World Soybean Production. SoyStats, 1. Available at: <http://soystats.com/international-world-soybean-production> [Accessed September 18, 2020]

Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH (2011) Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Pesq Agropec Bras Brasília* 46(9): 1070-1075.

Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56(1): 37-46.

DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* HAIRY ROOT INDUCTION SYSTEM IN DIFFERENT SOYBEAN CULTIVARS FOR GENE EXPRESSION AND GENOME EDITING STUDIES

Le Thi Nhu Thao^{1,2,3}, Nguyen Hong Nhung¹, Le Quang Huy¹, Bui Phuong Thao¹, Le Thu Ngoc¹, Pham Bich Ngoc^{1,2}, Chu Hoang Ha^{1,2}, Do Tien Phat^{1,2}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Nam Bo Agriculture College

SUMMARY

Hairy root induction system has been widely applied for studies of gene function, gene expression, and genome editing in numerous plant species. In this study, we developed and evaluated the performance of an *in vitro* hairy root induction system via *Agrobacterium rhizogenes* on several Vietnamese and international soybean cultivars. The efficacy of *in vitro* hairy root induction and of transformation using this system was varied and depended on soybean cultivars as well as transgenic constructs. The hairy root induction frequency of different soybean cultivars ranged from 61.67% to 100% after 5 days on culture medium. From 43.8% to 79.8% of hairy roots transformed with GFP-expressing construct showed transgene expression, while that for the construct with the *gus* gene was from 38.07% to 72.33%. Among tested soybean cultivars, DT26 demonstrated the highest transformation and gene expression efficacy with both investigated vectors. This hairy root induction system was further utilized for targeted knockout mutagenesis via CRISPR/Cas9 of two genes which are *G03* and *G09* in the DT26 soybean cultivar. Successful mutagenesis in the regions of targeted genes was confirmed by shifted and multiple bands compared to which of non-transgenic hairy root in PAGE analysis. Sequencing results of targeted regions presented various nucleotide deletions ranging between -3 bp and -25 bp in size in both two genes of interest. This study laid an important

Lê Thị Như Thảo *et al.*

basis for future gene function studies and targeted gene editing investigations on soybean plants in Vietnam.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, *CRISPR/Cas9*, *soybean*, *gus*, *hairy root*