

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁI SINH VÀ HỆ THỐNG CHUYỂN GEN CÀ CHUA (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) CỦA VIỆT NAM

Đỗ Xuân Đồng, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Hệ thống chuyển gen ở thực vật thông qua *Agrobacterium tumefaciens* cho phép nhanh chóng tạo ra giống cây trồng mang các tính trạng số lượng, chất lượng mong muốn. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu quy trình tái sinh và chuyển gen thông qua *Agrobacterium* cho 03 giống cà chua Việt Nam. Hệ thống tái sinh cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) thông qua đa chồi được tạo ra từ các lá mầm của giống cà chua Việt Nam khi nuôi cấy trên môi trường MS + 2 mg/l ZR cho tỷ lệ mẫu tái sinh thành cây từ 78 - 92% thay đổi ở các giống có kiểu di truyền khác nhau, tỷ lệ tái sinh cây hơn 95% với giống PT18 trên môi trường nuôi cấy MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 1,8 mg/l ZR + 20 g saccharose + 8 g agar. Các mẫu tái sinh thành mầm cây hoàn chỉnh sau 7 tuần nuôi cấy được cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 0,3 mg/l IAA, đạt $14 \pm 2,08$ rễ sau 2 tuần, cây hoàn chỉnh được trồng trên giá thể 40% đất, 30% trấu hun và 30% phân chuồng mục cho kết quả tốt nhất. Kết quả tái sinh cây ở trên được tiếp tục sử dụng cho nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen vào cây cà chua. Trước tiên, mẫu lá mầm của giống cà chua PT18 được nuôi cộng sinh với chủng vi khuẩn LBA4404 mang vector pBI121 chứa gen chỉ thị *GUS*. Sau đó, được chuyển sang môi trường tái sinh có kháng sinh chọn lọc (kan 50 mg/l) và tiếp theo là môi trường ra rễ trong thời gian 9 tuần. Tất cả những cây phát triển hoàn chỉnh được ngâm mẫu trong X-gluc để kiểm tra sự có mặt của gen *GUS*. Kết quả thu được 13,6% cây chuyển gen cho giống PT18.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, cà chua, chuyển gen, *GUS* (β -glucuronidase), *Lycopersicon esculentum* Mill.

MỞ ĐẦU

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) thuộc họ Solanaceae là một trong những loại rau có giá trị dinh dưỡng cao được nhiều người ưa chuộng, dễ sử dụng và được chế biến thành nhiều loại thực phẩm quan trọng đối với đời sống của con người trên thế giới. Quả chín thường được sử dụng làm rau ăn sổi cùng với nhiều loại rau tươi khác. Với sự thích ứng rộng rãi về khí hậu và thổ nhưỡng, cà chua được trồng phổ biến trên thế giới (Ahmad, 1976; Bose, Som, 1986).

Với những ưu việt trên, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới như Trung tâm nghiên cứu vaccine và bệnh truyền nhiễm (CIDV), Đại học Arizona (Mỹ)... đã chọn cây cà chua làm đối tượng chuyển gen để sản xuất các loại vaccine phòng bệnh cho người và động vật. Alvarez và đồng tác giả (2006) đã thành công trong việc chuyển gen mã hóa protein kháng bệnh viêm phổi và dịch hạch vào cây cà chua. Ngoài ra, nhiều nhà khoa học đã và đang tập trung nghiên cứu chuyển các gen có giá trị vào cây cà chua để tăng

năng suất, chất lượng, kháng lại sâu bệnh... (Fillatti *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2006; Omura *et al.*, 2007).

Để có thể tiến hành việc chuyển các gen mong muốn vào cây cà chua trước tiên phải có hệ thống tái sinh cây hoàn chỉnh và một quy trình chuyển gen hoạt động hiệu quả. Đã có nhiều tác giả (Gubis *et al.*, 2003; Chaudary *et al.*, 2001; Hu, Phillips, 2001; Moghaieb *et al.*, 2004; Uddin *et al.*, 2004) nghiên cứu về hệ thống tái sinh và chuyển gen *GUS* vào cây cà chua. Tuy nhiên, mỗi quy trình lại cho kết quả cụ thể với từng giống đặc trưng. Bên cạnh đó, nước ta vẫn chưa có một tác giả nào thông báo về một quy trình tái sinh và chuyển gen hoàn chỉnh. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng tái sinh và chuẩn hóa quy trình chuyển gen với giống cà chua đang được trồng phổ biến ở Việt Nam để phục vụ nghiên cứu tiếp sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Hạt giống cà chua PT18; 93D4103; Cà múi TS

do Viện Nghiên cứu Rau quả - Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cung cấp.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 và vector pBI121 do Viện Di truyền thực vật và Nghiên cứu cây trồng (IPK), Gatersleben, Cộng hòa liên bang Đức cung cấp.

Các loại môi trường nuôi cấy sử dụng trong thí nghiệm bao gồm: nảy mầm, tạo chồi, tái sinh, tạo rễ, đồng nuôi cấy (Bảng 1) được tham khảo từ các công trình nghiên cứu đã công bố và đã được bổ sung, thay đổi cho phù hợp (Murashige, Skoog, 1962; Gubis *et al.*, 2003; Uddin *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 1998).

Bảng 1. Các loại môi trường dùng trong thí nghiệm.

Môi trường	Thành phần
Nảy mầm	MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 20 g saccharose + 8 g agar
Cộng sinh	MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 2 mg/l BAP + 2mg/l NAA + 20 g saccharose + 8 g agar + dịch huyền phù thuốc lá
Tái sinh	MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + (1 - 2,2 mg/l ZR) và sau 3 tuần chuyển sang 1 mg/l ZR + kan 50 mg/l + cefotaxime 250 mg/l + 20 g saccharose + 8 g agar
Tạo rễ	MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + kan 50 mg/l + cefotaxime 250 mg/l + (0,1 - 0,5 mg/l IAA) + 20 g saccharose + 8 g agar
Tạo huyền phù thuốc lá	MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + kin 0,3 mg/l + 1 g NAA + 20 g saccharose
Nuôi cấy vi khuẩn (LB)	5 g/l yeast extract; 10 g/l tryptone; 10 g/l NaCl; 16 g/l agar; pH = 7
Tạo huyền phù vi khuẩn (MSA)	MS; 30 g/l saccharose; 100 μ M acetosyringone

Chú thích: MS: môi trường cơ bản của Murashige và Skoog (1962); ZR: Zeatin riboside; Kan: Kanamycin; Kin: Kinetin; IAA: 3-Indoleacetic acid; NAA: 1-Naphthaleneacetic acid; BAP: 6-Benzylaminopurine.

Phương pháp

Hạt cà chua được khử trùng bằng cách lắc nhẹ trong cồn 70% với thời gian 1 phút, Javel 30% cùng 0,1% Tween 20 trong thời gian 17 - 20 phút, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần. Sau khi khử trùng xong, hạt được thấm khô bằng giấy thấm vô trùng và đặt trên môi trường nảy mầm, số lượng 15 hạt/bình tam giác 250 ml. Các mẫu cây được đặt trong tối 48 h, sau đó chuyển ra buồng sinh trưởng (25°C, 16 h chiếu sáng/ngày, cường độ chiếu sáng 30 - 40 μ Em-2s-1) trong thời gian 7 ngày, các hạt sẽ phát triển thành cây có hai lá mầm (các lá mầm này được dùng làm nguyên liệu cho thí nghiệm tái sinh và chuyển gen).

Tạo dịch huyền phù *A. tumefaciens*: Vi khuẩn được lấy từ glycerol nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 220 vòng/phút trong 12 - 14 h. Dịch nuôi cấy được cấy trái trên môi trường LB thạch có bổ sung Kan 50 mg/l, nuôi ở 28°C trong 3 ngày. Một khuẩn lạc vi khuẩn được cấy chuyển vào 100 ml môi trường LB lỏng có bổ sung Kan 50 mg/l lắc 220

vòng/phút, 28°C qua đêm. Lấy ra 4 ml cho vào 50 ml môi trường LB lỏng mới, nuôi lắc tiếp 4 h trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào rồi hòa tan trong môi trường MSA.

Những cây đã có hai lá mầm được cắt hai đầu của lá mầm trong môi trường 1/2 MS lỏng bổ sung ZR 1 mg/l. Các mẫu cắt được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* ($OD_{600} = 0,3$) và đặt trên môi trường đồng nuôi cấy trong thời gian 48 h, tiếp theo mẫu được chuyển sang môi trường tái sinh với 2 mg/l ZR trong 2 tuần, sau đó chuyển sang môi trường mới với 1 mg/l ZR. Khi những mầm chồi phát triển được khoảng 2 - 3 cm (thời gian khoảng 7 tuần) thì cắt và chuyển sang môi trường tạo rễ kéo dài thành cây hoàn chỉnh (khoảng 3 tuần).

Cây non trong ống nghiệm có bộ rễ hoàn chỉnh được chuyển từ điều kiện *in vitro* ra nhà lưới trong giá thể 40% đất, 30% trấu hun hoặc mùn mục và 30% phân chuồng mục được trộn đều và xử lý sạch bệnh. Trong tuần đầu, cây non cần được che tránh ánh sáng chiếu trực tiếp.

Kiểm tra sự có mặt của gen *GUS* trong cây theo phương pháp nhuộm tế bào học của Jefferson và đồng tác giả (1987): Các mảnh lá được nhuộm với dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucoronide (X-gluc) 8 - 10 h trong tối ở nhiệt độ 37°C, sau đó rửa bằng cồn 70% và quan sát dưới kính hiển vi. Những vùng có gen *GUS* nhuộm màu xanh lam.

Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 30 - 40 μEm-2s-1, thời gian chiếu sáng 16 h sáng/ngày.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng tái sinh của một số giống cà chua trên một số loại môi trường

Trước đây, nhiều công trình nghiên cứu đã cho

rằng khả năng tái sinh cây từ lá mầm, lóng, lá, trụ dưới và trên lá mầm đều chịu ảnh hưởng lớn của nồng độ Zeatin, BAP (Gubis *et al.*, 2003; Cortina *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2000).

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ZR lên khả năng tạo chồi của một số giống cà chua cho thấy, ở nồng độ 2 mg/l, tỷ lệ tạo thành chồi và cây đạt cao nhất (92%) đối với giống PT18, hai giống còn lại cho tỷ lệ thấp hơn từ 78 - 83% (Bảng 2), điều này phù hợp với nhận định của Gubis và đồng tác giả (2003) rằng ngoài chất điều tiết sinh trưởng thì sự sai khác về kiểu di truyền giữa các giống cho kết quả tạo chồi cây cũng rất khác nhau. Từ kết quả trên, giống PT18 có tỷ lệ tạo thành chồi và cây cao nhất được chọn lựa và tiếp tục thử nghiệm ở các mức nồng độ ZR khác nhau để tối ưu hóa khả năng tạo chồi và cây. Kết quả trên bảng 3 cho thấy, nồng độ 1,8 mg/l ZR cho tỷ lệ tạo chồi cao nhất (96%) và hầu hết những cây tạo chồi đều tạo thành cây hoàn chỉnh (95%).

Bảng 2. Khả năng tái sinh của một số giống cà chua trên các loại môi trường.

Giống	Môi trường	*Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu tạo cây (%)
Cà múi TS		80	78
PT18	MS + 2 mg/l ZR và MS + 1 mg/l ZR	92	92
93D4103		83	81
Cà múi TS		70	70
PT18	MS + 1 mg/l ZR + 0,1 mg/l IAA	75	74
93D4103		71	71
Cà múi TS		50	45
PT18	MS + 0,5 mg/l IAA + 4 mg/l BAP	54	48
93D4103		51	46

*Mẫu lá mầm sử dụng là 100.

Bảng 3. Tối ưu hóa khả năng tạo chồi trên môi trường MS1 bổ sung Zeatin riboside.

Giống	(MS1 + ZR mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu tạo cây (%)
PT18	1,0	70	68
	1,2	71	68
	1,4	79	78
	1,6	85	85
	1,8	96	95
	2,0	93	92
	2,2	93	92

MS1 = MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + (1 - 2,2 mg/l ZR) và sau 3 tuần các mẫu cây được chuyển sang môi trường mới bổ sung 1 mg/l ZR.

Khả năng tạo rễ và ra cây

Đánh giá khả năng ra rễ và trồng cây ra bầu đất

là khâu quan trọng cuối cùng để tạo ra những cây cà chua có bộ rễ khỏe mạnh sử dụng hiệu quả nguồn dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng và phát triển

của cây. Theo Ling và đồng tác giả (1998), môi trường MS hoặc MS bổ sung IAA tăng cường khả năng tạo rễ *in vitro*. Các mầm cây dài khoảng 2 - 4 cm được cắt chuyển sang môi trường tạo rễ: MS bổ sung IAA nồng độ từ 0,2 - 0,5 mg/l. Kết quả sau 2 tuần nuôi cấy cho thấy, ngày bắt đầu tạo rễ nhanh nhất ($6,33 \pm 0,66$) và số rễ tạo thành nhiều nhất ($14 \pm 2,08$) trên môi trường nồng độ IAA 0,3 mg/l cho so với các nồng độ từ 0; 0,2; 0,4; 0,5 mg/l IAA lần lượt là: $8,33 \pm 0,33$ và $5,66 \pm 0,66$; $6,66 \pm 0,33$ và $10,66 \pm 0,88$; $7,66 \pm 0,33$ và $7,66 \pm 0,88$; $8,33 \pm 0,33$ và $7,33 \pm 1,45$ (Bảng 4).

Với mục đích xây dựng một quy trình nuôi cấy phục vụ chuyển gen, hệ thống tái sinh cây không chỉ được dừng lại ở giai đoạn tạo cây *in vitro* mà tiếp tục được hoàn thiện chuyển cây ra nhà lưới. Trong điều kiện *in vitro*, cây non được cung cấp

đầy đủ dinh dưỡng và ánh sáng. Vì vậy, khi đưa cây ra nhà lưới cây non phải trải qua giai đoạn thích nghi dần dần. Cây non có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh được chuyển từ điều kiện ống nghiệm ra trồng trên 3 loại giá thể với thành phần chủ yếu là đất phù sa sông Hồng, trấu hun và phân chuồng mục. Sau 2 tuần nuôi cấy trong buồng sinh trưởng ở nhiệt độ 23°C, cường độ chiếu sáng 30 $\mu\text{Em-2s-1}$, độ ẩm 90% với thời gian chiếu sáng 12 h trên ngày, tỷ lệ cây sống cũng như tốc độ phát triển rễ mới trên giá thể (40% đất, 30% trấu hun và 30% phân chuồng mục) tốt hơn so với 2 loại giá thể 100% đất, trấu và phân hoại mục tương ứng. Cây được trồng ra nhà lưới sau khi cây ra lá và rễ mới (khoảng 3 tuần sau khi ra bầu đất). Trong tuần đầu, cây non được che ánh nắng chiếu trực tiếp. Toàn bộ số cây trồng đều ra hoa, kết quả bình thường.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất bổ sung IAA lên quá trình tạo rễ.

Giống	Môi trường	Ngày bắt đầu ra rễ (ngày)	Số rễ tạo thành sau 2 tuần (rễ)
PT18	MS	$8,33 \pm 0,33$	$5,66 \pm 0,66$
	MS + 0,2 mg/l IAA	$6,66 \pm 0,33$	$10,66 \pm 0,88$
	MS + 0,3 mg/l IAA	$6,33 \pm 0,66$	$14 \pm 2,08$
	MS + 0,4 mg / IAA	$7,66 \pm 0,33$	$7,66 \pm 0,88$
	MS + 0,5 mg / IAA	$8,33 \pm 0,33$	$7,33 \pm 1,45$

Kết quả chuyển gen *GUS*

Hoàn thiện quy trình tái sinh là khâu quan trọng trong quy trình chuyển gen, nhưng để tăng hiệu quả của gen chuyển vào trong cây thì việc tạo dựng quy trình chuyển gen có hiệu quả là nhân tố then chốt để

tạo ra những giống cây trồng chuyển gen mong muốn. Do vậy, chúng tôi đã thí nghiệm sử dụng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 chứa vector pBI121 mang gen chỉ thị *GUS* chuyển vào cây cà chua nhằm tạo dựng một quy trình chuyển gen hiệu quả cho giống cà chua của Việt Nam.

Bảng 5. Kết quả chọn lọc và tái sinh cây trên môi trường Kan 50 mg/l và ZR 1,8 mg/l sau 9 tuần.

Giống	MN	MCL	MTC	MTCC	CSSCL (%)
PT18	300	144	96	78	13,6
Không chuyển gen	20	2	0	0	0

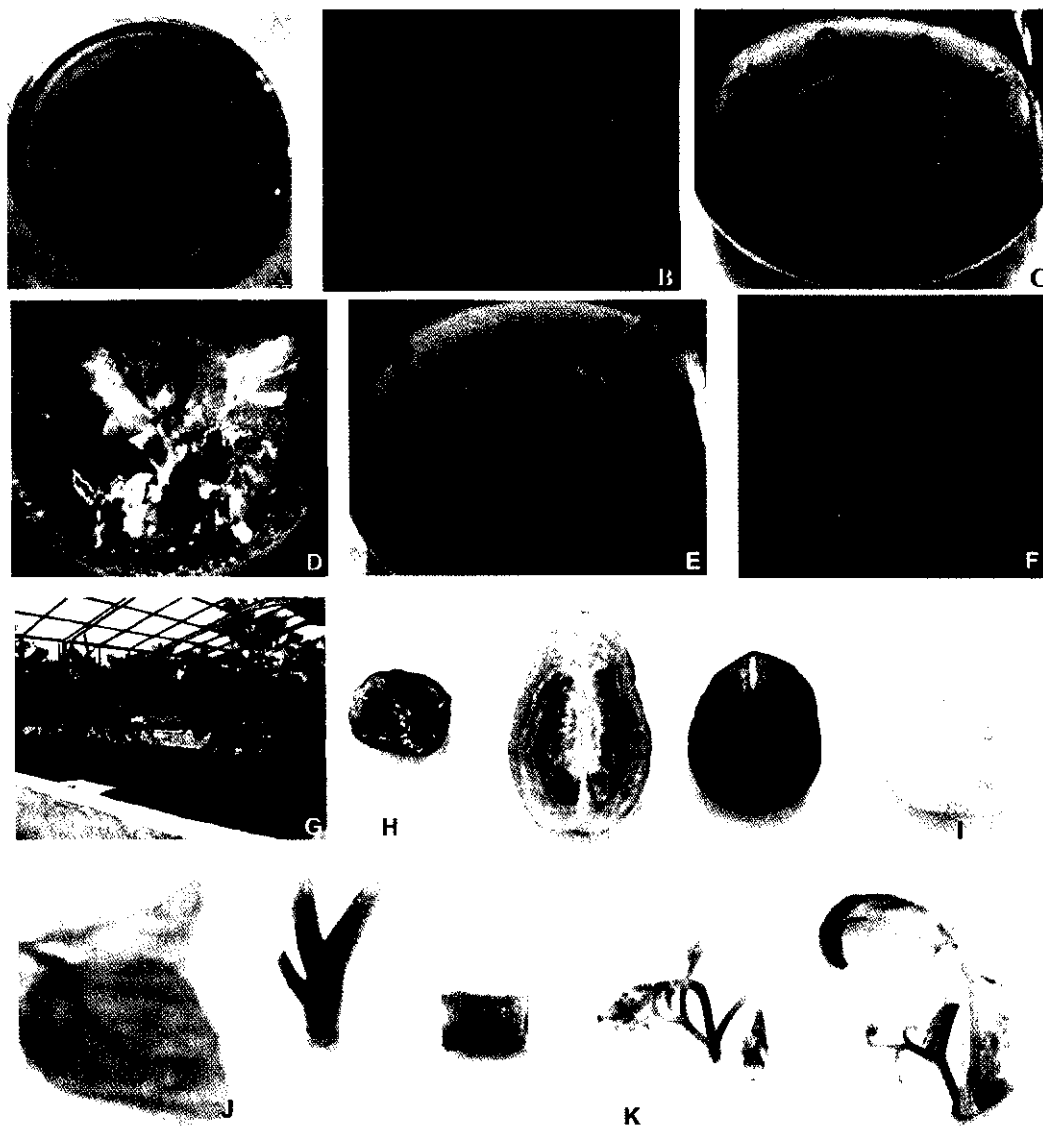
Chú thích: MN: mẫu xử lý nhiễm; MCL: mẫu sống sau chọn lọc; MTC: mẫu phát triển thành chồi; MTCC: mẫu tạo thành cây con; CSSCL: cây sống sau chọn lọc.

Từ những kết quả nghiên cứu về sự tái sinh cây trên, chúng tôi áp dụng tương tự với việc chuyển gen *GUS* vào trong cây. Đầu tiên, các mẫu lá mầm này mầm sau 7 ngày được cắt hai đầu và nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* ($\text{OD}_{600} = 0,3$) trong thời gian 30 phút, lắc không liên tục, sau đó

thâm khô mẫu và chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy (có bổ sung dịch huyền phù thuốc lá) 48 h trong tối, cuối cùng chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc. Kết quả thống kê tỷ lệ tái sinh cây trên môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh Kan 50mg/l cho thấy: chọn lọc lần thứ nhất sau 3 tuần, số mẫu

sống có màu xanh (48%), và sau 5 tuần những mẫu có màu xanh phát triển thành các mầm chồi (66%), và từ những chồi này phát triển thành cây con (81,2%), cuối cùng những cây con sống sót có bộ rễ sinh trưởng, phát triển bình thường sau chọn lọc là 13,6% so với mẫu ban đầu (Bảng 5).

Tất cả những cây tái sinh được trồng trong nhà lưới và được kiểm tra cây có mang gen *GUS* bằng cách nhuộm màu với dung dịch X-gluc. Kết quả cho thấy, hầu như các mẫu đều thể hiện màu xanh lục, điều này cũng có nghĩa là các cây sống sót cuối cùng được trồng trong nhà lưới đều mang gen chỉ thị *GUS*.



Hình 1. Các giai đoạn tái sinh cây và nhuộm X-gluc cây cà chua. A: mẫu đồng nuôi cây; B: mẫu trên môi trường tái sinh; C: mầm chồi tái sinh phát triển; D: cây tái sinh; E: cây ra rễ; F: cây hoàn chỉnh trồng trong bầu đất; G: Cây trồng trong nhà lưới; H: quả cà chua chuyển gen *GUS*; I: Quả đối chứng không chuyển gen; J: lá đối chứng không chuyển gen. K: lá, hoa, thân cây chuyển gen *GUS*.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình tái sinh với giống cà chua của Việt Nam (PT18) đạt hiệu suất tái sinh cao trên 95% ở tổ hợp môi trường MS chứa folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 1,8 mg/l ZR + 20 g saccharose + 8 g agar.

Kết quả chuyển thành công gen *GUS* vào giống cà chua PT18 đạt tỉ lệ 13,6% cây có bộ rễ sinh trưởng và phát triển bình thường, điều đó cho thấy hệ thống chuyển gen hoạt động tốt đối với giống cà chua của Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài "Nghiên cứu cơ sở khoa học và công nghệ để tạo vaccine ăn được bằng cây trồng chuyển gen" thuộc chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên, lĩnh vực Khoa học Sự sống, mã số 623106.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad KU (1976) *Flower, fruit and vegetable*, 3rd edn. Alhaz Kamisuddin Ahmad, Banglow No. 2. Farmgate, Dhaka-15, Bangladesh: 470.
- Alvarez LM, Pinyerd LH, Crisantes DJ, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM, Mason SH, Cardineau AG (2006) Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* 24: 2477-2490.
- Bose TK, Som MG (1986) *Vegetable crops in India*. 1st Edn. Naya Prakash, Calcutta: 262-264.
- Chaudary Z, Feroz I, Ahmed W, Rashid H, Mirza B, Quraishi A (2001) Varietal response of *Lycopersicon esculentum* L. to callogenesis and regeneration. *Online J Biol Sci* 1 (12): 1138-1140.
- Cortina C, Culianez-Macia AF (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 76(3): 269-275.
- Costa CGM, Nogueira STF, Figueria LM, Otoni CW, Brommonschenkel HS, Cecon RP (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Rep* 19(3): 327-332.
- Fillatti JJ, Kiser J, Rose R, Comai L (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology* 5: 726-730
- Gubis J, Lajchova Z, Farago J, Jukekova Z (2003) Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J Genet Plant Breed* 39 (1): 9-14.
- Hu W, Phillips CG (2001) A combination of overgrowth-control antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 12-18.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan, MW (1987) "Gus fusions": β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. *EMBO J* 16: 2901-2907.
- Ling HQ, Kriseleit D, Ganai MW (1998) Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Plant Cell Rep* 17: 843-847.
- Moghaieb AER, Saneoka H, Fujita K (2004) Shoot regeneration from *gus*-transformed tomato (*Lycopersicon esculentum*) hairy root. *Cel Mol Biol Lett* 9: 439-449.
- Murashige T., and Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Omura T, Watanabe S, Lijima Y, Aoki K, Shibata D, Ezura H (2007) Molecular and genetic characterization of transgenic tomato expressing 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Biotechnol* 24: 107-115.
- Uddin FM, Taher AM, Islam AMS, Hossain ZM (2004) Effect of variety and plant growth regulators in MS medium on shoot induction from virus infected calli of tomato. *J Biol Sci* 4 (4): 521-526.
- Wang Z, Ying T, Zhang Y, Bao B, Huang X (2006) Characteristics of transgenic tomatoes antisense for the ethylene receptor genes *LeETR1* and *LeETR2*. *J Zhejiang Univ Sci B* 7(7): 591-595.

STUDY ON PLANT REGENERATION AND TRANSFORMATION SYSTEM OF SOME VIETNAMESE TOMATO CULTIVARS (*LYCOPERSICON ESCULENTU* MILL.)

Do Xuan Dong, Chu Hoang Ha, Le Tran Binh *

Institute of Biotechnology

SUMMARY

A comprehensive transformation system in plant mediated by *Agrobacterium tumefaciens* nowadays allows to rapidly improve the yield and quality of many crop plant species. In this study, a regeneration system for Vietnamese tomato cultivars has been developed employing multishoot generation from cotyledons. The results showed a high regeneration rate for three studied cultivars between 78 and 92% on MS + 2 mg/l ZR media (cotyledons must be transferred into media containing 1 mg/l ZR after two weeks). However, the highest rate 95% was obtained for PT18 cultivar on media containing MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 1.8 mg/l ZR + 20 g saccharose + 8 g agar. After seven weeks, cotyledons could develop into complete new shoots. The shoots had been subsequently transferred into media (MS + folic acid 50 mg/l + biotin 5 mg/l + 0,3 mg/l IAA) to promote development of root system. After two weeks, an average number of $14 \pm 2,08$ roots per shoot had been achieved. Finally, successful plant would be cultivated on mixture of 40% soil, 30% rice husk and 30% organic fertilizer. This regeneration system has been used for developing a gene transformation protocol of tomato. At first, the cotyledons of PT18 cultivar were inoculated with *A. tumefaciens* LBA 4404 strain carrying pBI121 vector which contains reporter *GUS* gene. After that, these cotyledons must be transferred into regeneration media supplements with 50 mg/l kan for selection and subsequently into root induction media for nine weeks. All of completely developed plants were checked by X-gluc staining to confirm the presence of *GUS* gene. Results indicated that 13.6% of plants have been successfully carried *GUS* gene.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, β -glucuronidase (*GUS*), multiple shoot regeneration, tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), transformation

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-7564691; E-mail: binh@ibt.ac.vn