

R

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

V.KHCNVN
V.CNSH
V.KHCNVN
V.CNSH

V.KHCNVN
V.CNSH

Báo cáo Tổng kết Khoa học và Kỹ thuật Đề tài

**NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG CÔNG NGHỆ GEN
ĐỂ TẠO CÂY CHUYỂN GEN NÂNG CAO SỨC CHỐNG CHỊU
ĐỐI VỚI SÂU BỆNH VÀ NGOẠI CẢNH BẤT LỢI**

<i>Mã số:</i>	KC.04.13
<i>Chủ nhiệm Đề tài:</i>	PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH
<i>Cơ quan chủ trì:</i>	Viện Công nghệ Sinh học
<i>Cơ quan chủ quản:</i>	Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
<i>Thời gian thực hiện:</i>	10/2001 - 10/2004

Hà Nội, 2005

Bản báo cáo viết xong ngày 1/2/2005

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04.13

5428

26/7/05

Lời cảm ơn

Chủ nhiệm đề tài KC.04.13 xin chân thành cảm ơn 06 cơ quan khoa học gồm: (i) Viện Công nghệ Sinh học, (ii) Viện Sinh học Nhiệt đới, Tp. Hồ Chí Minh, (iii) Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội, (iv) Viện Di truyền Nông nghiệp, Hà Nội, (v) Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long và Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây có sợi, Ninh Thuận thuộc 03 cơ quan chủ quản là: (i) Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, (ii) Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn và (iii) Bộ Công nghiệp đã ủng hộ, tạo điều kiện thuận lợi về trang thiết bị và nhân lực cho các tập thể cán bộ chủ trì và tham gia thực hiện đề tài này.

Chủ nhiệm và cán bộ thực hiện đề tài KC.04.13 xin chân thành cảm ơn Vụ Quản lý Khoa học & Công nghệ các ngành kinh tế của Bộ Khoa học và Công nghệ và Ban chủ nhiệm Chương trình KC.04 đã tạo điều kiện về kinh phí và quản lý quá trình thực hiện các nội dung nghiên cứu của đề tài trong suốt 3 năm qua.

Hà nội, ngày tháng năm 2005

CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI



PGS. TS. Lê Trần Bình

MỤC LỤC

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI CHỦ TRÌ THỰC HIỆN.....	1
DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THAM GIA THỰC HIỆN VÀ CƠ QUAN PHỐI HỢP.....	2
BÀI TÓM TẮT.....	4
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT.....	6
LỜI MỞ ĐẦU.....	7
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC VÀ NGOÀI NƯỚC.....	9
1.1. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	9
1.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước.....	12
CHƯƠNG 2. LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	13
2.1. Mục tiêu của đề tài.....	13
2.2. Nội dung nghiên cứu cần thực hiện.....	13
2.2.1. <i>Sưu tập và phân lập gen</i>	13
2.2.2. <i>Chuyển gen vào cây trồng</i>	13
2.2.3. <i>Đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm và nhà lưới</i>	14
2.2.4. <i>Thử nghiệm trên đồng ruộng và đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen</i>	15
2.3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu.....	16
2.3.1. <i>Vật liệu nghiên cứu</i>	16
2.3.2. <i>Phương pháp nghiên cứu</i>	17
2.3.3. <i>Dạng sản phẩm kết quả tạo ra</i>	18
2.3.4. <i>Nhu cầu kinh tế xã hội và địa chỉ áp dụng</i>	19
CHƯƠNG 3. NHỮNG NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN.....	20
3.1. Kết quả phân lập gen.....	20
3.1.1. <i>Kết quả phân lập gen vip</i>	20
3.1.2. <i>Kết quả xây dựng thư viện gen từ chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> AB51 có hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà</i>	35
3.1.3. <i>Phân lập gen <i>Pi-2(t)</i> kháng bệnh đạo ôn</i>	42
3.1.4. <i>Kết quả phân lập gen <i>Pi-1(t)</i> kháng bệnh đạo ôn</i>	46
3.2. Hoàn thiện các quy trình chuyển gen kháng sâu và gen chịu hạn vào cây bông vải.....	47
3.2.1. <i>Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây bông vải</i>	47
3.2.2. <i>Hoàn thiện hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây bông in vitro phục vụ chuyển gen</i>	48
3.2.3. <i>Xây dựng qui trình chuyển gen qua ống phần bằng vi tiêm</i>	64
3.2.4. <i>Kết luận và đề nghị</i>	74
3.3. Kết quả tạo dòng cây hồng chuyển gen kháng sâu.....	75
3.3.1. <i>Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây hồng</i>	75
3.3.2. <i>Hệ thống tái sinh cây hồng</i>	75
3.3.3. <i>Hoàn thiện quy trình chuyển gen vào cây hồng</i>	79
3.4. Chuyển gen Anti-ACO giữ hoa lâu tàn và gene <i>cryIA(c)</i> kháng sâu vào cây hoa cúc.....	86
3.4.1. <i>Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây hoa cúc</i>	86
3.4.2. <i>Vật liệu và phương pháp</i>	87

3.4.3. Kết quả chuyển gen ở cây hoa cúc.....	89
3.4.4. Kết luận và hướng nghiên cứu sắp tới.....	95
3.5. Kết quả tạo dòng lúa kháng rầy và kháng sâu bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau.....	96
3.5.1. Căn cứ khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây lúa.....	96
3.5.2. Hoàn thiện quy trình chuyển gen trên giống lúa nhóm indica và tạo dòng lúa biến đổi gen kháng rầy nâu.....	98
3.5.3. Chuyển gen cryIA(b, c) kháng sâu và gen Xa21 kháng bệnh bạc lá vào cây lúa thông qua A. tumefaciens.....	107
3.6. Các phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen.....	139
3.6.1. Đặt vấn đề.....	139
3.6.2. Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm.....	140
3.6.3. Thử nghiệm cây chuyển gen trong nhà kính.....	146
3.6.4. Lai tạo để kiểm tra cây chuyển gen.....	157
3.6.5. Kết luận và đánh giá cây chuyển gen.....	159
3.7. Cơ sở khoa học và quy trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng.....	160
3.7.1. Cơ sở khoa học, thực tiễn và xã hội của việc đánh giá an toàn sinh học đối với GMO.....	160
3.7.2. Cơ chế quản lý rủi ro.....	167
3.7.3. Các thử nghiệm đồng ruộng.....	169
3.7.4. Kết luận.....	170
CHƯƠNG 4. TỔNG QUÁT HÓA VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC.....	171
4.1. Kết quả về khoa học.....	171
4.2. Kết quả nổi bật và khả năng áp dụng.....	173
4.3. Trình độ công nghệ.....	174
4.4. Khả năng áp dụng.....	175
4.5. Đào tạo.....	175
4.6. Sản phẩm khoa học của đề tài.....	176
4.7. Hợp tác quốc tế.....	177
4.8. Tình hình sử dụng kinh phí.....	178
4.9. Danh sách các công trình công bố.....	178
4.10. Hạn chế của đề tài.....	180
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	181
5.1. Kết luận.....	181
5.2. Đề nghị.....	182
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	183

Mục lục các bảng

Bảng 1	Danh sách những người chủ trì thực hiện	1
Bảng 2	Hoạt lực diệt côn trùng của các đỉnh protein sau khi sắc kí trao đổi anion	26
Bảng 3	Hoạt lực diệt côn trùng của phân đoạn protein có kích thước 44 kDa tách chiết từ chủng BIAB51 đối với ấu trùng bọ hà tuổi 2	27
Bảng 4	Kết quả xác định trình tự nucleolít của gen <i>vip3</i> ở 3 mẫu V13, V14 và V15	30
Bảng 5	Thành phần các môi trường tái sinh cây và tạo đa chồi	49
Bảng 6	Sự hình thành chồi sau 5 tuần	50
Bảng 7	Sự hình thành cụm chồi trên các môi trường S2-S5	51
Bảng 8	Tỉ lệ kéo dài chồi và chiều cao chồi trên các môi trường E0-E2	52
Bảng 9	Tỉ lệ tạo rễ trên môi trường R1 và R2	53
Bảng 10	Thành phần các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo	55
Bảng 11	Thành phần các môi trường nhân và duy trì mô sẹo	56
Bảng 12	Ảnh hưởng của các tổ hợp hoóc môn sinh trưởng khác nhau lên sự hình thành mô sẹo và phôi soma của các giống bông SSR60F, 254 và VN36P	57
Bảng 13	Tỉ lệ mô sẹo sống sót sau khi cấy chuyển lên các môi trường nhân và duy trì mô sẹo	60
Bảng 14	Số dòng bông và số lượng hạt thu được của các giống sau vi tiêm thu được tại Trại Thực nghiệm Cổ Nhuế, Hà Nội năm 2001-2002	66
Bảng 15	Số hoa, quả và tỷ lệ đậu quả của các công thức	67
Bảng 16	Tỷ lệ đậu quả theo giờ tiêm/ngày của các công thức	67
Bảng 17	Tỷ lệ quả dị hình, số mùi/quả và số hạt/quả, và của các công thức	68
Bảng 18	Tổng số hạt thu được sau tiêm của các công thức	69
Bảng 19	Kết quả sàng lọc cây bông chuyển gen sau vi tiêm bằng Test kháng sinh trên lá	70
Bảng 20	Tỷ lệ cây có phản ứng dương tính đối với các nồng độ kháng sinh hygromycine của các công thức	71
Bảng 21	Kết quả tái sinh chồi từ mảnh lá sau 5 tuần nuôi cấy	77
Bảng 22	Kết quả tái sinh chồi từ cuống lá sau 5 tuần nuôi cấy	77
Bảng 23	Kết quả tái sinh chồi từ thân cây sau 5 tuần nuôi cấy	78
Bảng 24	Tỷ lệ tái sinh chồi và cây chuyển gen của các mảnh lá trên môi trường có 4mg/l PPT sau khi nhiễm với <i>Agrobacterium tumefaciens</i> và mẫu lá đối chứng	81
Bảng 25	Ảnh hưởng của các tổ hợp (NAA và BAP) đến tỷ lệ tái sinh từ mẫu lá giống HCT1	89
Bảng 26	Ảnh hưởng của các tổ hợp (NAA và BAP) đến tỷ lệ tái sinh từ mẫu lá hoa cúc giống HCV1	89
Bảng 27	Ảnh hưởng của tiền nuôi cấy lên sức sống của mẫu sau lây nhiễm giống HCT1	91
Bảng 28	Ảnh hưởng của tiền nuôi cấy đối với sức sống của mẫu sau lây nhiễm giống HCV1	91
Bảng 29	Tỷ lệ có biểu hiện GUS ở các giống lúa thí nghiệm	101
Bảng 30	Số dòng tái sinh từ các mô sẹo qua chọn lọc	101
Bảng 31	ảnh hưởng của thông số bắn trên hiệu quả chuyển gen ở giống Taipei 309	103
Bảng 32	Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện GUS của các giống lúa	103
Bảng 33	Số dòng tái sinh từ các giống được chuyển gen	104
Bảng 34	Kết quả chuyển gen plasmid pUbi-GNA	105
Bảng 35	Kết quả thử rầy đối với các dòng lúa KDML105 chuyển gen GNA	106
Bảng 36	Kết quả chọn lọc và tái sinh cây	113
Bảng 37	Thang điểm đánh giá tình trạng nhiễm bệnh đối với lúa	115
Bảng 38	Tỉ lệ bệnh và tình trạng nhiễm bệnh của 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo chuyển gen Xa21 sau 7 và 14 ngày gây nhiễm bệnh bạc lá với khuẩn <i>Xanthomonas</i>	116
Bảng 39	Kết quả kiểm tra các dòng lúa C71 chuyển gen <i>CryIA(c)</i>	119
Bảng 40	Cấp hại của sâu đục thân	125

Bảng 41	Hiệu quả biến đổi gen bằng <i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 (pUBB-Man)	126
Bảng 42	Hiệu quả biến đổi gen bằng <i>A. tumefaciens</i> LBA 4404 (pUBC-Man)	127
Bảng 43	Đánh giá sự phân ly của các cây chuyển gen qua chọn lọc mannose	129
Bảng 44	Tỷ lệ chồi héo (%) ghi nhận trên 30 dòng giống lúa IR64 ở thế hệ T ₁ ở 5, 10, 15, 20 ngày sau khi chủng sâu	131
Bảng 45	Tỷ lệ sâu sống (%) và trọng lượng sâu sống 25 ngày sau chủng	132
Bảng 46	Cấp hại (0-9) và phản ứng của các dòng lúa thử nghiệm đối với sâu đục thân	133
Bảng 47	Số sâu sống, sâu chết và tỷ lệ sâu chết trên các dòng lúa thử nghiệm	135
Bảng 48	So sánh khả năng nảy mầm giữa 2 giống bông kháng sâu và đối chứng trên môi trường MS có bổ sung Km	141
Bảng 49	Tỷ lệ sống sót ở các mảnh lá của các giống bông trên môi trường MS có bổ sung Km	142
Bảng 50	Kết quả thử độc tính của CryIA(c) ở mô lúa chuyển gen trên ấu trùng sâu đục thân	148
Bảng 51	Độc tính của protein từ cây lúa chuyển gen CryIA(c) (0.2g thân lá) đối với ấu trùng của sâu đục thân lúa hai chấm	148
Bảng 52	Một số chỉ tiêu theo dõi của các dòng lúa chuyển gen khi bị xử lý hạn 30 ngày	152
Bảng 53	Chỉ số chịu hạn tương đối của một số dòng lúa chuyển gen	155
Bảng 54	Chỉ số trung bình các chỉ tiêu của cây xử lý mặn	156
Bảng 55	Số lượng hạt lai thu được	158
Bảng 56	Một số chỉ tiêu thu được từ cây lúa lai	158
Bảng 57	Báo cáo tóm tắt kết quả thực hiện từ 10/2001 - 10/2004	173
Bảng 58	Khả năng áp dụng của đề tài	175
Bảng 59	Danh sách các học viên được đào tạo	175
Bảng 60	Danh sách các cán bộ được nâng cao trình độ	176
Bảng 61	Hợp tác quốc tế	177

Mục lục các hình

Hình 1	Kết quả phản ứng lai miễn dịch với kháng thể kháng protein Vip2	21
Hình 2	Kết quả phản ứng Western-Blotting của protein Vip3 với kháng thể kháng Vip3	22
Hình 3	Sắc ký đồ protein ngoại bào BtAB51 từ cột Resource Q 1 ml trên hệ FPLC	23
Hình 4	Điện di SDS-PAGE của các phân đoạn protein tinh chế sau sắc ký trao đổi ion	24
Hình 5	Sắc ký đồ lọc gel mẫu protein ngoại bào BtAB51 từ cột Superose 12 trên hệ FPLC	25
Hình 6	Sắc ký đồ lọc gel mẫu protein ngoại bào BtAB51 từ cột Superose 12 trên hệ FPLC	26
Hình 7	Kết quả điện di sản phẩm PCR gen vip3	28
Hình 8	Kết quả biến nạp sản phẩm ghép nối vào tế bào khả biến <i>E.coli</i> chủng DH5 α	29
Hình 9	Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid bằng <i>EcoRI</i>	29
Hình 10	Sơ đồ đọc trình tự gen vip3 với các mối V2.1, V2.2, V3.1, V3.2	30
Hình 11	Sơ đồ thiết kế vector 35S/vip3A/NOST	32
Hình 12	Sản phẩm cắt bằng <i>BamHI</i> & <i>SacI</i>	33
Hình 13	Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 8 dòng khuẩn lạc với 2 cặp mối	34
Hình 14	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp với tổ hợp <i>BamHI</i> & <i>SacI</i>	34
Hình 15	ADN tách từ chủng <i>Bt</i> AB51	37
Hình 16	ADN tổng số được cắt bởi <i>Sau</i> 3A	38
Hình 17	ADN vector qua xử lý	39
Hình 18	Thư viện gen sơ cấp	40
Hình 19	Kết quả cắt ADN vector tái tổ hợp	41
Hình 20	Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mối RG64	43
Hình 21	Kết quả điện di các plasmid tái tổ hợp mang gen kháng đạo ôn <i>Pi-2(t)</i>	44
Hình 22	Điện di kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp cắt bằng enzym giới hạn <i>EcoRI</i>	45
Hình 23	Trình tự gen kháng đạo ôn <i>Pi-1</i> từ giống lúa Tẻ tếp so với trình tự nucleotit trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế (C101Lac)	46
Hình 24	Quá trình tạo đa chồi từ phôi	52
Hình 25	Sự hình thành mô sẹo trên một số môi trường cảm ứng tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy giống 254	59
Hình 26	Nhân và duy trì mô sẹo của giống VN 36P	61
Hình 27	Tái sinh cây bông giống SSR qua giai đoạn mô sẹo	63
Hình 28	Bầu nhụy sau khi vật cánh hoa và cắt vòi nhụy	65
Hình 29	Đưa kim tiêm và bầu nhụy	65
Hình 30	Bắt đầu đẩy xy lạnh tiêm	65
Hình 31	Đã đẩy xong xy lạnh tiêm	65
Hình 32	Thu hoạch hạt bông T0 sau thí nghiệm vi tiêm	65
Hình 33	Ảnh hưởng của vi tiêm đến quả bông	68
Hình 34	Triệu trứng sau ba ngày	72
Hình 35	Triệu trứng sau bốn ngày	72
Hình 36	Quy trình sàng lọc cây chuyển gen	72
Hình 37	Kết quả PCR các dòng bông chuyển gen	73
Hình 38	Biểu hiện của gen GUS trong lá cây hồng chuyển gen	81
Hình 39	Cây Hồng tái sinh	82
Hình 40	Cây Hồng chuyển gen phát triển, cây đối chứng chết trong môi trường chọn lọc PPT	82

Hình 41	Kết quả PCR của gen <i>cryIA(c)</i>	83
Hình 42	Kết quả thử tính kháng sâu của các dòng hồng chuyển gen so với đối chứng không chuyển gen	84
Hình 43	Kết quả phân tích Southern blot của cây Hồng	85
Hình 44	Kết quả Western blot của cây Hồng	85
Hình 45	Cây <i>Paulownia</i> chuyển gen	85
Hình 46	Giống cúc thí nghiệm: HCV1 và HCT1	87
Hình 47	Cấu trúc plasmid pART 27 mang gen <i>Bt (Cry IAc)</i>	88
Hình 48	Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá giống HCV1	90
Hình 49	Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá giống HCT1	90
Hình 50	Các mẫu lá cây hoa cúc biến nạp	91
Hình 51	Chồi biến nạp HCT1 trên môi trường chọn lọc (sau 4 tuần)	92
Hình 52	Chọn lọc cây hoa cúc chuyển gen <i>CryIA(c)</i>	92
Hình 53	Chồi biến nạp trong môi trường ra rễ	92
Hình 54	Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR của giống HCT 1 với mỗi của đoạn promotor 35S	93
Hình 55	Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu HCV1	93
Hình 56	Kết quả lai ADN xác định gen anti-ACO trong cây hoa cúc chuyển gen	94
Hình 57	Kết quả lai ADN xác định gen <i>CryIA(c)</i> trong cây hoa cúc chuyển gen	94
Hình 58	Các dòng cúc chuyển gen trồng trong nhà lưới	95
Hình 59	Sự sống sót và phát triển của các mô sẹ trên môi trường chọn lọc (Hyg 50 mg/l) sau 2 tuần nuôi cấy	102
Hình 60	Cây chuyển gen KDML105 tái sinh và sự biểu hiện gen <i>gus</i>	102
Hình 61	Máy bán gen PSD He1100	103
Hình 62	Kết quả thử nghiệm sự biểu hiện tạm thời gen <i>gus</i>	104
Hình 63	Các dòng chuyển gen trồng trong nhà kính	104
Hình 64	Sự sinh trưởng bình thường của cây chuyển gen	104
Hình 65	Thử nghiệm tính kháng rầy nâu của các dòng lúa chuyển gen GNA	105
Hình 66	Tạo mô sẹ ở giống lúa C71	111
Hình 67	Mô sẹ trên môi trường chọn lọc	111
Hình 68	Chọn lọc mô sẹ	112
Hình 69	Cây tái sinh	112
Hình 70	Kết quả nhân đoạn gen <i>CryIA(c)</i> bằng kỹ thuật PCR	113
Hình 71	Vi khuẩn <i>Xanthomonas oryzae</i> mọc trên môi trường phân lập	114
Hình 72	Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra cây chuyển gen	118
Hình 73	Một số hình ảnh về sàng lọc và đánh giá cây lúa chuyển gen <i>cry1A(c)</i>	120
Hình 74	Kết quả PCR các dòng lúa chuyển gen kháng sâu đục thân thể hệ T4	120
Hình 75	Dòng C67T4-11 kháng SDT	120
Hình 76	Đối chứng C71 không chuyển gen	120
Hình 77	Sơ đồ vector pUBB-Man	121
Hình 78	Sơ đồ vector pUBC-Man	121
Hình 79	Trồng các dòng lúa thử nghiệm	124
Hình 80a	Bướm sâu đục thân hai chấm được nuôi trong nhà lưới	124
Hình 80b	Lồng nuôi bướm sâu đục thân	124
Hình 80c	Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi	124
Hình 80d	Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi	124
Hình 80e	Sâu đục thân nở (sau 7 ngày tạo ra sâu con)	124

Hình 81a	Thử nghiệm tính kháng trong đĩa petri	125
Hình 81b	Thử nghiệm tính kháng toàn cây	125
Hình 82	Phân tích Southern blot các dòng T0/ IR64 chuyển gen với plasmit	127
Hình 83	Phân tích Southern của các dòng lúa Một bụi (T ₀) chuyển gen với pUBC-Man	128
Hình 84	Cây chuyển gen thế hệ T ₂ giống IR64 trồng tại nhà lưới Viện lúa ĐBSCL	128
Hình 85	Cây chuyển gen thế hệ T ₂ giống KDML105 trồng tại nhà lưới Viện lúa ĐBSCL	128
Hình 86	Sâu sổng sót trên các dòng lúa thử nghiệm	133
Hình 87	Các dòng lúa thử nghiệm được thử sâu 5 sâu mới nở/đoạn thân/3 lần lặp lại và tách thân để quan sát sâu sau 5 ngày	134
Hình 88	Cây bông chuyển gen và cây bông đối chứng nảy mầm trên môi trường chọn lọc	141
Hình 89	Mảnh lá của cây bông chuyển gen (A) và cây bông đối chứng (B) trên môi trường chọn lọc	142
Hình 90	Phân tích ELISA các dòng bông chuyển gen	143
Hình 91	Sự thể hiện của gen <i>gus</i> của rễ cây lúa chuyển nạp gen kháng sâu trong dung dịch X-gluc	144
Hình 92	Sự thể hiện của gen <i>gus</i> (1,1kb) và gen <i>hph</i> (0,76kb) ở cây đã chuyển gen (1-4) so với đối chứng (NT) và so với vạch chuẩn (M)	144
Hình 93	Kết quả lai ADN (Southern blotting)	145
Hình 94	Kết quả lai ARN (Northern blotting)	145
Hình 95	Kết quả phản ứng Western blot	146
Hình 96	Thử tính kháng Km của 2 giống bông kháng sâu (phải) và giống bông đối chứng không kháng sâu. Nồng độ Km lần lượt từ trái sang là 0; 0,25 ; 0,5; 1; 1,5g/L	147
Hình 97	Kết quả phép thử sinh học đối với cây chuyển gen <i>CryIAc</i> .	148
Hình 98	Các dòng lúa Zhongzua phục hồi sau 30 ngày xử lý hạn	152
Hình 99	Bộ rễ và thân các dòng lúa Zhongzua sau xử lý hạn	153
Hình 100	Biến động trọng lượng khô của rễ thân của các dòng	154
Hình 101	Chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng	154
Hình 102	Biến động chiều dài thân ở các dòng	156
Hình 103	Biến động trọng lượng hạt ở các dòng	157
Hình 104	Cây lúa lai	159
Hình 105	Nhà kính ở Trại Thực nghiệm Sinh học Cổ Nhuế, Hà nội bảo đảm kín côn trùng để thử nghiệm và lai tạo cây trồng chuyển gen	159
Hình 106	Nhà lưới ở Trại Thực nghiệm Sinh học Cổ Nhuế, Hà nội bảo đảm kín côn trùng để thử nghiệm và lai tạo cây trồng chuyển gen	159
Hình 107	Bướm Monarch sinh trưởng và phát triển bình thường	163
Hình 108	Sâu cắn chồi ở bông	169
Hình 109	Cánh đồng bông chuyển gen Bt	169
Hình 110	Thử nghiệm sinh học cây đu đủ chuyển gen kháng virus đốm vòng	170

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI CHỦ TRÌ THỰC HIỆN

Số TT	Họ và tên, Học hàm học vị	Chức vụ, đơn vị	Trách nhiệm trong đề tài	Chương mục trong báo cáo
1	Lê Trần Bình PGS. TS.	<i>Viện trưởng, Trưởng phòng Viện CNSH</i>	Chủ nhiệm đề tài Chủ trì đề tài nhánh	Toàn bộ nội dung báo cáo
2	Nguyễn Đức Thành PGS.TS.	<i>Trưởng phòng Viện CNSH</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.1.3: 3.1.4
3	Vũ Đức Quang PGS.TS	<i>Trưởng Bộ môn Viện Di truyền NN</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.4
4	Lê Quang Quyến TS.	<i>Viện trưởng Viện Nghiên cứu cây Bông và CCS, Nha Hồ</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.2.3
5	Trần Thị Cúc Hoà TS.	<i>Viện Lúa ĐBSCL</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.5.3
6	Nguyễn Văn Uyển GS.TS	<i>Phòng Công nghệ gen Viện SHND</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.3
7	Hồ Hữu Nhị PGS.TS.	<i>Viện KHKTNNVN</i>	Chủ trì đề tài nhánh	3.6

Bảng 1. Danh sách những người chủ trì thực hiện

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THAM GIA THỰC HIỆN VÀ CƠ QUAN PHỐI HỢP

1. Nội dung: *Nghiên cứu phân lập gen diệt côn trùng và gen kháng bệnh đạo ôn*

Cơ quan tham gia: Viện CNSH

Những người tham gia thực hiện: PGS.TS. Lê Trần Bình, PGS.TS. Nguyễn Đức Thành, ThS. Phạm Bích Ngọc, CN. Phạm Thị Trà, CN. Nguyễn Trung Nam, CN. Lê Hồng Ngọc, TS. Chu Hoàng Hà, ThS. Trần Quốc Trọng, CN. Phạm Quang Chung, CN. Đào Xuân Hải

2. Nội dung: *Nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh ở cây bông vải và chuyển gen vào cây bông qua ống phấn*

Cơ quan tham gia: Viện CNSH, Viện Nghiên cứu Cây bông & CCS, Nha Hồ

Những người tham gia thực hiện: PGS.TS. Lê Trần Bình, CN. Trương Thu Thủy, TS. Đinh Thị Phòng, CN. Nguyễn Hữu Cường, KS. Đỗ Tiến Phát, KS. Trịnh Minh Hợp, TS. Lê Quang Quyến, KS. Nguyễn Thị Nhã, KS. Thái Thị Lệ Hằng, TS. Đặng Minh Tâm, KS. Nguyễn Thị Dung

3. Nội dung: *Nghiên cứu chuyển gen anti-ACO giữ hoa lâu tàn và gen Bt kháng sâu vào cây hoa cúc*

Cơ quan tham gia: Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Công nghệ sinh học

Những người tham gia thực hiện: PGS.TS. Vũ Đức Quang, TS. Đặng Trọng Lương, ThS. Lâm Đại Nhân, ThS. Nguyễn Huy Hoàng, CN. Nguyễn Thị Lan Hoa, CN. Doãn Thị Hoà, CN. Phí Công Nguyên, CN. Đặng Minh Trang.

4. Nội dung: *Tạo cây Hồng kháng sâu bằng phương pháp chuyển gen*

Cơ quan tham gia: Viện Sinh học Nhiệt đới

Những người tham gia thực hiện: PGS.TS. Nguyễn Văn Uyển, TS. Lê Tấn Đức, TS. Nguyễn Hữu Hổ.

5. Nội dung: *Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu*

Cơ quan tham gia: Viện Lúa ĐBSCL, Viện CNSH

Những người tham gia thực hiện: TS. Trần Thị Cúc Hoà, PGS.TS. Lê Trần Bình, TS. Nguyễn Thị Lộc, KS. Nguyễn Hồng Châu, KS. Đỗ Xuân Đồng, TS. Lê Thị Thu Hiền, CN. Nguyễn Phương Thảo, TS. Đinh Thị Phòng, ThS. Phạm

Bích Ngọc, CN. Nguyễn Hữu Cường, CN. Bùi Văn Thắng.

6. Nội dung: *Phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen*

Cơ quan tham gia: Viện KHKTNNVN, Viện CNSH.

Những người tham gia thực hiện: PGS.TS. Hồ Hữu Nhị, PGS.TS. Lê Trần Bình, KS. Đoàn Thu Thủy, ThS. Phạm Bích Ngọc, TS. Hoàng Kim Oanh, CN. Phan Trọng Hoàng, CN. Nguyễn Hoàng Nam.

BÀI TÓM TẮT

Đề tài KC.04.13 được xây dựng nhằm mục tiêu kỹ thuật chuyển gen ứng dụng từng bước vào việc cải tiến giống cây trồng, trước mắt tập trung cho các loài cây như bông vải, hoa cúc, hồng và lúa nhằm nâng cao tính chống chịu đối với sâu, bệnh hoặc ngoại cảnh bất lợi. Đề tài đã phối hợp được 6 cơ quan đầu ngành trong cả nước triển khai thực hiện và thu được những kết quả chính sau đây:

Phân lập và thiết kế gen: Đối với hoàn cảnh nước ta, để có thể làm chủ các nguồn gen có giá trị, việc tiếp tục phân lập gen là một yêu cầu tiên quyết để phát triển và ứng dụng công nghệ chuyển gen vào công tác cải tiến giống cây trồng. Viện Công nghệ Sinh học (Viện CNSH) đã tiếp nhận và thiết kế lại các gen *cryIA(b,c)*, gen *Xa 21*, gen *chitinase* và tiến hành phân lập thành công nhóm gen *ACO antisense* (Nguyễn Huy Hoàng et al.), gen *Pi* kháng bệnh đạo ôn ở lúa, đặc biệt là nhóm gen *vip* mã hoá loại protein độc đối với côn trùng thuộc Bộ Coleoptera (Cánh cứng). Các nhóm gen này đã được ưu tiên chuyển nạp vào một số loại cây (không làm lương thực và thực phẩm) nhằm nâng cao tính chống chịu đối với sâu, bệnh (nấm, vi khuẩn và virus).

Hoàn thiện các qui trình chuyển gen: Đối với cây bông đề tài đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh cây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, cho phép chuyển gen thông qua *Agrobacterium*, đồng thời hoàn chỉnh phương pháp chuyển gen qua ống phần ở hầu hết các giống bông vải đang trong cơ cấu giống sản xuất đại trà. Trên đối tượng hoa cúc đề tài đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh và chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR và lai Southern cho thấy đã thu được 14 cây hoa cúc mang gen anti-ACO và 20 cây mang gen kháng sâu *cryIA(c)*. Trên đối tượng cây hồng (Paulownia) đã nhận được 5 cây hồng chuyển gen kháng sâu biểu hiện qua kết quả lai Southern, Western và biotest dương tính. Đặc biệt trên đối tượng là cây lúa đã xây dựng thành công hệ thống chuyển gen bằng phương pháp bắn gen và thông qua *A. tumefaciens* ở một số giống lúa *indica* và đã nhận được các dòng chuyển gen thế hệ T_1 , T_2 cho tỉ lệ kháng sâu cao tới 100%. Nổi bật đối với cây lúa là đã sử dụng hệ thống chọn lọc bằng mannose thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hoặc chất kháng thuốc trừ cỏ nhằm đưa hệ thống chuyển gen sạch, giải quyết triệt để những lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen..

Đánh giá an toàn GMC: Bên cạnh đó đề tài đã xây dựng được một số định hướng về phương pháp đánh giá an toàn sinh học cho cây chuyển gen kháng sâu ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô nhà lưới, nhằm mục đích đánh giá an toàn sinh học 2 - 3 dòng cây chuyển gen có triển vọng được trồng thử trên đồng ruộng có kiểm soát nhằm tìm hiểu kết quả chuyển gen và ảnh hưởng của cây chuyển gen lên môi trường sinh thái và khả năng phát tán tự nhiên của gen chuyển. Thử khả năng gây dị ứng của protein lạ do chuyển gen tạo ra nếu có.

Thử nghiệm cây trồng chuyển gen: Cùng với việc tạo cây chuyển gen trong phòng thí nghiệm và trồng thử nghiệm ngoài nhà lưới, đề tài đã xây dựng cơ sở khoa học và qui trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng.

Tóm lại kết quả thu được của đề tài KC.04.13 không những là những đóng góp khoa học cho nghiên cứu và phát triển lĩnh vực tạo giống cây trồng bằng công nghệ sinh học hiện đại mà còn góp phần chuẩn bị các mặt cơ sở khoa học, kỹ thuật và văn bản pháp lý cho công tác quản lý và triển khai loại sản phẩm mới đang gây ra các cuộc tranh luận trong nước và trên thế giới.

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ARNase	Ribonuclease
AS	Asetosyringone
ATP	Adenosine triphosphate
ATSH	An toàn sinh học
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
bp	base pair
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV35S- P	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor
CNSH	Công nghệ Sinh học
cry	Crystal gene = Gen mã hoá protein tinh thể độc tố diệt côn trùng của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>
DNA	Axit Deoxyribonucleic
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetate Axit
Et-Br	Ethidium Bromide
gus	β -Glucuronidase gene = gen mã hoá β -Glucuronidase
GMC	Cây trồng chuyển gen
GMO	Sinh vật chuyển gen
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside
Kb	Kilobase
KDa	Kilo dalton
Km	Kanamycine
LB	Luria and Bertani
MS	Môi trường nuôi cấy theo Murashige & Skoog
NOS-P	Nopaline Synthase Promotor
nptII	Neomycine phosphotransferase II gene=Gen mã hoá neomycine phosphotransferase II
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis=Điện di biến tính trên gel polyacrylamide
T-DNA	Transfer-DNA=DNA chuyển
Ti-plasmit	Tumor inducing plasmit=Plasmit gây khối u thực vật
Vip	Vegetative insecticidal protein=protein sinh dưỡng diệt côn trùng
Vir	Virulence Region=Vùng gây độc có khả năng tạo khối u
X-gal	5-bromo-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide
NAA	1 Naphthyl Acetic Acid
2,4-D	Dichlorophenoxy acetic acid

LỜI MỞ ĐẦU

Các kỹ thuật tạo giống truyền thống như lai tạo và chọn lọc nhân tạo đã được con người sử dụng hàng ngàn năm qua để tạo ra các cây trồng có đặc tính nông học thích hợp và riêng biệt. Tuy nhiên những kỹ thuật này đòi hỏi nhiều thời gian và có thể phải trải qua nhiều thế hệ mới có được những tính trạng mong muốn và loại bỏ những tính trạng không mong muốn. Công nghệ sinh học (CNSH) sử dụng kỹ thuật di truyền để biến đổi cây trồng bằng cách đưa trực tiếp những gen có giá trị vào bộ gen của cây nhận (kể cả gen của các loài vốn không có quan hệ họ hàng) và nhanh chóng tạo ra cây trồng biến đổi gen (GMC) mang những đặc tính mong muốn. Hiện nay CNSH hiện đại và các cây trồng GM đang được ứng dụng rộng rãi và đã có những đóng góp đáng kể. Theo thông báo tóm tắt của tổ chức Tổ chức Dịch vụ Quốc tế ứng dụng Công nghệ Sinh học vào Nông nghiệp (International Service for the Acquisition of the AgriBiotech Applications, ISAAA) chỉ mới trong thời gian chưa đầy 10 năm, bắt đầu từ 1995 với 0,5 triệu ha cây trồng chuyển gen đầu tiên được gieo trồng, đến năm 2003 đã có đến trên 67 triệu ha và cuối năm 2004 có tới gần 100 triệu ha cây chuyển gen được trồng trên qui mô toàn cầu. Riêng trong giai đoạn 1986 -1997, trên toàn cầu có tới 25000 thử nghiệm trên đồng ruộng đối với các cây trồng biến đổi di truyền. Trong đó, gần 3/4 các cuộc thử nghiệm được tiến hành tại Mỹ, tiếp đến là Canada, châu Âu, châu Mỹ la tinh và châu Á. Các thử nghiệm này tập trung vào 10 loại tính trạng trên đối tượng là 60 loại cây trồng. Đến nay phần lớn các quốc gia ở Đông Nam Á cũng đang nhập cuộc.

Ở Việt Nam, lĩnh vực nghiên cứu tạo sinh vật GM đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu. Nhiều gen quý có giá trị ứng dụng như năng suất, chất lượng, chống chịu đã được phân lập và nghiên cứu nhằm chuyển vào cây trồng. Những vấn đề như thiết kế vector, hoàn thiện hệ thống tái sinh cây khởi đầu cho nghiên cứu chuyển gen cũng nhận được sự quan tâm của nhiều nhóm tác giả. Một số công trình nghiên cứu chuyển gen chọn lọc và sàng lọc như gen kháng kanamycine, hygromycine, gen mã hoá β -glucuronidase (*gus*) vào thuốc lá, lúa cũng được tiến hành nhằm mục đích hoàn thiện các quy trình chuyển gen làm cơ sở cho các bước chuyển gen có giá trị vào các đối tượng cây trồng này... Đã có nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau như bắn gen, chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được áp dụng thành công trên một loạt các đối tượng cây trồng quan trọng như: lúa, khoai lang, cà chua, thuốc lá...

Cụ thể là trong Chương trình CNSH giai đoạn 1996 - 2000, Viện CNSH đã thực hiện đề tài cấp nhà nước có nội dung về chuyển gen ở cây trồng trong đó gen *Xa21* kháng bạc lá ở lúa và gen *cry* đã được chuyển thành công vào giống lúa C71. Ngoài ra, trong khuôn khổ các đề án hợp tác trong nước và quốc tế, những vấn đề nghiên cứu tăng cường tính chịu hạn, chịu mặn ở cây lúa, chuyển gen kháng virus xoắn vòng vào cây đu đủ... đã và đang được triển khai hiệu quả.

Xuất phát từ những cơ sở nghiên cứu trên, trong chương trình Khoa học Công nghệ cấp Nhà nước KC.04, Viện CNSH phối hợp cùng với 05 Viện nghiên cứu khác trong cả nước tiến hành đề tài KC.04.13 *“Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi”*.

CHƯƠNG 1.

TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC VÀ NGOÀI NƯỚC

1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC

Lĩnh vực CNSH đã làm nên nhiều điều kỳ diệu góp phần nâng cao hiệu quả của sản xuất và đáp ứng nhu cầu của đời sống con người. Chỉ tính riêng trong lĩnh vực nông nghiệp, nhiều giống cây trồng vật nuôi có giá trị đã được chọn tạo bằng con đường CNSH. Nhiều gen quý như các gen quy định năng suất, chất lượng, chống chịu đã được phân lập và chuyển vào cây trồng vật nuôi tạo nên những giống lý tưởng.

Sinh vật chuyển gen (GMO) cho năng suất cao, đem lại lợi ích cho người sản xuất là điều đã được khẳng định qua khoa học và thực tiễn. Ở nước ta, trước năm 2001, các dự án nghiên cứu CNSH quốc gia vẫn được hỗ trợ từ các Chính phủ và tổ chức quốc tế. Từ năm 2001, Chính phủ đã đầu tư 3 dự án nghiên cứu về GMO. Những dự án này liên quan đến nhiều cây trồng quan trọng của Việt Nam như bông, hoa, cây có củ và cây rừng. Tuy nhiên, trong lĩnh vực chuyển gen tạo các sinh vật biến đổi di truyền, Việt Nam vẫn còn xuất phát chậm hơn so với thế giới hàng chục năm. Do điều kiện còn hạn chế nên các công trình nghiên cứu về chuyển gen còn ít.

Một số phòng thí nghiệm đã và đang được nhà nước đầu tư bước đầu và có điều kiện gửi các cán bộ đi thực tập ở những phòng thí nghiệm tiên tiến của nước ngoài. Do vậy, chúng ta đã làm chủ được các kỹ thuật cơ bản của công nghệ gen như phân lập và xác định trình tự gen, thiết kế và biến nạp gen vào tế bào vi sinh vật, động vật, thực vật, nghiên cứu biểu hiện gen... Hiện tại, một số công trình nghiên cứu là cơ sở để tạo GMO đang được triển khai như nghiên cứu gen thủy phân và lên men tinh bột, gen hormon sinh trưởng ở cá, gen chịu hạn, lạnh ở lúa, gen mã hoá protein tinh thể độc tố có hoạt tính diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và các gen có giá trị khác.

Trong các lĩnh vực tạo GMO, nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu, ứng dụng chủ yếu tại các phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học và Viện Sinh học Nhiệt đới (thuộc Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam), Viện Di truyền Nông nghiệp và Viện Nghiên cứu Lúa đồng bằng sông Cửu Long (thuộc Bộ NN & PTNT). Một số công trình nghiên cứu

chuyển gen chọn lọc như gen kháng kanamycin, hygromycin... đã được tiến hành nhằm mục đích hoàn thiện các quy trình chuyển gen vào một số cây trồng quan trọng làm cơ sở cho các bước chuyển gen có giá trị vào các đối tượng cây trồng này. Lã Tuấn Nghĩa & CS (1995) đã chuyển gen *GUS* và gen kháng kanamycin vào cà chua.... Một số phòng thí nghiệm đã thu được thành công nhất định khi nghiên cứu tạo GMO. Nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau đã được nghiên cứu và áp dụng thành công để đưa các gen có giá trị vào hàng loạt cây trồng quan trọng như lúa, thuốc lá, đu đủ, cà chua, khoai tây, cải bắp, cải dầu... Năm 1994, Phan Tố Phượng & CS đã thành công trong việc sử dụng phương pháp gián tiếp thông qua vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens* để chuyển gen vào cây *Arabidopsis*. Vào năm 1998, cũng chính nhóm tác giả này đã công bố kết quả chuyển gen *Xa21* vào giống lúa Việt Nam bằng sử dụng súng bắn gen. Gần đây, tại Viện Di truyền Nông nghiệp, nhóm nghiên cứu của Đặng Trọng Lương đã tiến hành phân lập và thiết kế vectơ mang gen tổng hợp insulin để chuyển vào cây lúa mì; thiết kế vectơ và chuyển gen *cryIA(c)* vào cây cải bắp. Ngoài Đặng Trọng Lương & CS, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Văn Uyển tại Viện Sinh học Nhiệt Đới, Thành phố Hồ Chí Minh cũng đã tạo được các cây thuốc lá, đậu xanh, cải bông, cải xanh và cây cà tím bằng phương pháp chuyển gen sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105. Hầu hết các cây trồng biến đổi di truyền này mang gen *bar*, gen *cryIA(c)* và gen chỉ thị *gusA*. Trên lĩnh vực này, Viện Công nghệ Sinh học nói riêng đã đào tạo được đội ngũ cán bộ, thu thập và phân lập được hàng chục loại gen quý có giá trị. Viện đã và đang tiến hành nghiên cứu các giống cây trồng chuyển gen. Trong chương trình CNSH mang ký hiệu KHCN-02 giai đoạn 1996-2000, Viện Công nghệ Sinh học đã thực hiện đề tài công nghệ chuyển gen ở cây trồng, trong đó gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá ở lúa do vi khuẩn gây ra và gen *cry* mã hoá protein tinh thể độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được chuyển vào lúa. Trước đó, Viện cũng đã tiến hành các nghiên cứu phân lập gen chịu lạnh ở cây lúa. Viện Công nghệ Sinh học đã tham gia thực hiện đề án INCO18 với Bỉ, Pháp, Tây Ban Nha và Trung Quốc về tăng cường tính chịu hạn và chịu mặn ở cây lúa bằng công nghệ chuyển gen. Cũng trong chương trình hợp tác quốc tế, được sự hỗ trợ của ISAAA, Viện đã và đang tiến hành nghiên cứu chuyển gen kháng virus đốm vòng vào cây đu đủ và đã thu được các cây đu đủ chuyển gen trong nhà lưới. Gần đây, Viện đang hợp tác với Viện Nghiên cứu cây bông và cây có sợi để triển khai chuyển gen *cry* và gen chịu hạn tạo cây bông kháng sâu và chịu hạn.

Kết quả của những nghiên cứu trên là những cây chuyển gen đã được tạo ra và lưu giữ trong điều kiện *in vitro* và trong điều kiện nhà kính. Tuy nhiên, tất cả các cây trồng chuyển gen được tạo ra ở Việt Nam mới chỉ tồn tại ở quy mô thí

nghiệm và chờ thử nghiệm. Hiện nay, chúng ta chưa có quy chế cho việc tiến hành thử nghiệm các cây trồng này ở ngoài đồng ruộng.

Việt Nam hiện nay và trong thời gian dài nữa đã và sẽ còn là một nước nhập khẩu các sản phẩm CNSH hiện đại là chính. Hiện nay chưa có cơ quan nào thống kê, đánh giá đầy đủ tình trạng các giống cây con thuộc GMO, số lượng vi sinh vật lạ, các sản phẩm của chúng được sử dụng trong nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, dược phẩm đã nhập vào Việt Nam. Do chúng ta chưa có văn bản pháp lý để quản lý thống nhất trên cả nước nên các hoạt động nghiên cứu, ứng dụng, bảo quản, sản xuất, xuất nhập khẩu, vận chuyển GMO hoặc sản phẩm, phụ phẩm của chúng đang trôi nổi tự do, không thể quản lý hay kiểm soát được. Mặc dù chúng ta chưa tạo ra được cây trồng chuyển gen ở quy mô thương mại và sản phẩm của GMO chưa nhiều nhưng ở nước ta hiện nay đang tồn tại một số cây trồng chuyển gen cũng như lưu hành trong thương trường một số sản phẩm biến đổi gen. Trong số đó phải kể đến cây lúa và cây bông chuyển gen *cry* được nhập không chính thức. Ngoài ra, một phần khá lớn lượng dầu đậu tương cũng như ngô trong thành phần thức ăn gia súc nhập vào Việt Nam đều là sản phẩm biến đổi di truyền (không dán nhãn). Năm 1995 - 1996 một số công ty chăn nuôi liên doanh đã nhập hàng chục ngàn tấn ngô từ Mỹ. Không ai có thể trả lời ngô đó là GMO hay không và cũng có nhiều thức ăn chín được nhập từ nước ngoài như thịt, trứng, sữa... cũng có thể là sản phẩm của cơ thể sống biến đổi gen (LMO) (Tạp chí Hoạt động Khoa học số 10/2000). Hiện nay Quỹ Rockefeller đang tài trợ cho Việt Nam (và các nước châu Á khác) tiếp nhận cây lúa vàng (Golden Rice) giàu tiền vitamin A (β -caroten) tạo được nhờ chuyển gen tổng hợp caroten từ cây hoa thủy tiên vàng vào cây lúa. Về vấn đề chuyển gen đối với vật nuôi, hiện tại, Viện Công nghệ Sinh học đang triển khai và tạo được giống cá chép trắng và cá bống mang gen sản xuất ra hormone sinh trưởng tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm.

Khá nhiều hội thảo liên quan đến GMO đã được tổ chức ở Việt Nam. Ngày 26 tháng 5 năm 2000, Liên hiệp các Hiệp hội Khoa học và kỹ thuật Việt Nam đã tổ chức Hội thảo khoa học về "Các sinh vật biến đổi di truyền - GMO" với sự tham gia của nhiều nhà khoa học trong cả nước. Các đại biểu tham dự Hội thảo đã trình bày các tham luận xoay quanh vấn đề GMO trên thế giới và xu hướng nghiên cứu, ứng dụng tại Việt Nam. Hội thảo đã thống nhất một số điểm chính: CNSH nói chung và công nghệ gen nói riêng đã đạt được nhiều thành tựu to lớn trong giải quyết một số vấn đề lương thực, thực phẩm và dược phẩm mà các công nghệ thông thường không thể đạt được. Tuy nhiên, việc áp dụng công nghệ gen tại Việt Nam cần có chọn lọc và thận trọng. Các vấn đề liên quan đến rủi ro cần được nghiên cứu và cần sớm có văn bản pháp quy về an toàn sinh học (ATSH). Công bố thông tin cần hết sức thận

trọng vì đây là vấn đề nhạy cảm, có liên quan đến lợi ích quốc gia. Cần tuyên truyền rộng rãi cho công chúng am hiểu về GMO. Đề nghị chính phủ đặc biệt quan tâm và có chính sách ưu tiên phát triển nghiên cứu công nghệ gen.

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU NGOÀI NƯỚC

Năm 1984, trên thế giới đã có một số nghiên cứu thành công khi chuyển gen vào cây trồng. Đến nay, vấn đề cải biến giống cây trồng đã phát triển vượt bậc. Theo thông báo tóm tắt của tổ chức ISAAA trong giai đoạn 1986 -1997, trên toàn cầu có tới 25.000 thử nghiệm trên đồng ruộng đối với các cây trồng biến đổi di truyền. Trong đó, 72% các cuộc thử nghiệm được tiến hành tại Mỹ, tiếp đến là Canada, châu Âu, châu Mỹ la tinh và châu Á. Các thử nghiệm này tập trung vào 10 loại tính trạng trên đối tượng là 60 loại cây trồng.

Năm 2003, diện tích trồng cây chuyển gen tiếp tục tăng với tỉ lệ hơn 15% so với năm 2002. Theo đánh giá, diện tích trồng cây chuyển gen toàn cầu năm 2003 là 67,7 triệu ha tăng 40 lần so với năm 1996 là 1,7 triệu ha, thu hút khoảng 7 triệu nông dân ở 18 nước tham gia. Có 5 quốc gia chính trồng cây chuyển gen là Mỹ (48,2 triệu ha), Argentina (13,9 triệu ha), Canada (4,4 triệu ha), Braxin (3 triệu ha) và Trung Quốc (2,8 triệu ha). Trong đó, Braxin là nước lần đầu tiên tham gia trồng thử nghiệm và thương mại hoá cây chuyển gen trên diện tích 3 triệu hecta đứng hàng thứ 4 trên thế giới.

Nhìn chung hiện nay, thương mại hóa các sinh vật GM trong nông nghiệp tập trung chủ yếu vào các giống khác nhau của các cây trồng chính là đậu tương (36,5 triệu ha), ngô (12,4), bông (6,8), và cải dầu (3). Trong đó, hai tính trạng được tập trung chuyển gen nhiều nhất là kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng. Vào năm 2003, diện tích trồng cây chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ là 44,2 triệu hecta (73%) chủ yếu là cây ngô, đậu tương, bông và 12,2 triệu hecta (18%) trồng cây chuyển gen kháng sâu, tăng 2,1 triệu hecta so với năm 2002 tập trung chủ yếu vào hai loại cây trồng là bông và ngô Bt. Ngoài ra, một số thử nghiệm nhỏ trồng cây đu đủ, bí, khoai tây chuyển gen kháng virus, gen chín chậm và một số tính trạng khác (Jame). Hiện nay, trừ những giống cây công nghiệp như bông vải, các giống cây lương thực kia đều có mặt trong tất cả các loại thực phẩm cho con người và thức ăn dùng cho chăn nuôi. Các sản phẩm GM này đã được phân phối khắp nơi, không những có mặt ở châu Mỹ, châu Úc. Châu Âu mà còn ở các nước thứ ba thông qua hình thức viện trợ.

CHƯƠNG 2.

LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài KC.04.13 tập trung giải quyết các mục tiêu và nội dung nghiên cứu sau đây:

Tiến hành phân lập và thiết kế các gen có ích từ nguồn trong và ngoài nước để thực hiện việc chuyển các gen trên vào một số giống cây trồng như cây bông vải, cây hoa cúc, cây trồng rừng như paulownia (Cây hồng) và cây lương thực như cây lúa nhằm nâng cao tính chống chịu đối với sâu, bệnh (nấm, vi khuẩn và virus) hoặc ngoại cảnh bất lợi (hạn và mặn) và nâng cao chất lượng sản phẩm.

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU CẦN THỰC HIỆN

2.2.1. Sưu tập và phân lập gen

- Thông qua các tổ chức phi chính phủ, các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam, từng bước tiếp cận, ký các thoả thuận được phép sử dụng bản quyền một số công nghệ và gen của CAMBIA (Úc), Monsanto (Mỹ), Syngenta, Zeneca (Anh), Đại học Ottawa (Canada), Viện Max Planck Golm, Đức. Trong khuôn khổ nghiên cứu của đề tài, chúng tôi đã sưu tập được các gen *cryIA(b,c)*, *anti-ACO*, *GNA*, *Xa21*, *TPS*, *P5CS*, *OAT*, *nhaA*.
- Phân lập gen *vip* kháng sâu từ *Bacillus thuringiensis*
- Phân lập gen *Pi-2t* và *Pi-1t* từ cây lúa kháng đạo ôn

2.2.2. Chuyển gen vào cây trồng

2.2.2.1. Chuyển gen vào cây bông vải

Hiện nay khó khăn lớn nhất đối với nghề trồng bông là giống năng suất thấp và bị sâu hại rất nghiêm trọng. Giống năng suất cao có thể tạo ra bằng con đường lai tạo, nhưng giống kháng sâu thì duy nhất phải chọn con đường chuyển gen. Các gen thuộc nhóm *cry* đang được sử dụng rộng rãi. Viện Công nghệ sinh học đã tập hợp được các gen trên, thông qua kết hợp với Viện NC cây bông và cây có sợi để tiến hành chuyển gen kháng sâu qua ống phấn vào cây bông vải.

2.2.2.2. Chuyển gen vào cây hoa

Nghề trồng hoa cắt đang góp phần thay đổi cơ cấu cây trồng và tăng thu nhập cho người nông dân. Tuổi thọ của hoa cắt là yếu tố quyết định việc mở rộng thị trường trong và ngoài nước. Tham gia vào quá trình già hóa của hoa làm nở và rụng cánh nhanh là các gen điều khiển sinh tổng hợp ethylen. Các gen antisense của chúng hoạt động theo cơ chế tạo ARN sợi kép không dịch mã thành protein được. Hiện nay, các gen ACO antisense ức chế tạo ethylen đã được phân lập. Cơ chế thứ hai là làm tăng sinh tổng hợp các loại phytohormon thuộc nhóm cytokinin làm cho rau xanh và hoa tươi lâu. Cơ chế sử dụng các kích thích sinh tổng hợp cytokinin đã được Gan (1995) quan tâm.

Hiện nay, Viện CNSH đang có trong tay nhóm gen ACO antisense, gen chitinase và gen bar. Các nhóm gen này sẽ được chúng tôi sử dụng để chuyển vào một số loại cây hoa với mục đích làm hoa lâu tàn.

2.2.2.3. Chuyển gen vào cây trồng rừng

Cây trồng rừng thường bị sâu phá hoại, mặt khác các đối tượng cây thân gỗ vào loại khó nuôi cấy mô vì vậy cần sớm có những nghiên cứu, dù chỉ là bước đầu để tiếp cận nội dung này. Đối tượng chính được chọn là cây Paulownia vốn là cây đã được nuôi cấy thành công ở nhiều phòng thí nghiệm trong nước. Các gen lựa chọn là gen chỉ thị (GUS, kháng Kanamycin) để tối ưu hệ thống chuyển gen và tiếp đến là các gen kháng côn trùng (*cry*) và kháng bệnh. Mục đích lớn nhất là tạo được phương pháp chuyển gen ở cây gỗ trồng rừng và tạo được một số dòng chuyển gen có giá trị.

2.2.2.4. Chuyển gen vào cây lúa

Hiện nay, khá nhiều gen kháng bệnh đã được đưa vào cây trồng lương thực và thực phẩm như ngô, khoai tây và cải dầu. Lúa là cây trồng lương thực quan trọng số một của nước ta, các giống lúa thuộc 2 nhóm quan trọng nhất là lúa hàng hóa và lúa đặc sản chất lượng cao đều bị nhiễm bệnh nặng, nhất là khi chuyển chúng từ phía Nam ra hoặc từ Trung Quốc về: vụ xuân bị đạo ôn và vụ mùa bị bạc lá. Gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá vi khuẩn sẽ được chuyển vào 2-3 giống chọn lọc cho mỗi nhóm nhằm tạo ra tính kháng rộng các nòi *Xanthomonas oryzae* (Zhang và CS, 1998). Gen *GNA* chuyển vào giống phía nam để tạo tính kháng rầy nâu (Sudhakar và CS, 1998). *CryIA(b,c)* sẽ được chuyển vào lúa để tạo tính kháng sâu. Tính chịu hạn và chịu muối được tăng cường thông qua gen *P5CS* điều khiển sinh tổng hợp prolin.

2.2.3. Đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm và nhà lưới

Trước hết phải khẳng định nguyên liệu tạo được là cây chuyển gen thực sự thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử ở mức độ phòng thí nghiệm. Xác định sự có mặt của gen trong tế bào cây chuyển gen được tiến hành bằng kỹ thuật PCR, với cặp mồi đặc hiệu của gen chuyển và DNA của dòng cây cần kiểm tra. Xác định gen chuyển được gắn vào genom cây tái sinh hay không phải thực hiện phép lai phân tử Southern mà mẫu dò là đoạn gen chuyển được đánh dấu huỳnh quang còn DNA nhân cao phân tử được tách từ mô của cây chuyển gen. Xác định gen chuyển có được phiên mã thành mRNA hay không, tức là có được bộ máy sinh tổng hợp protein chấp nhận hay không được thực hiện bằng kỹ thuật lai Northern giữa mẫu dò là đoạn DNA của gen đánh dấu huỳnh quang và ARN toàn phần của mô cây chuyển gen. Bước cuối cùng là xác định gen chuyển có biểu hiện và tạo ra sản phẩm cuối cùng của nó là protein bằng kỹ thuật lai Western giữa protein của cây chuyển gen và kháng thể đặc hiệu với protein đó được tinh sạch từ nguồn khác. Mặt khác, hoạt tính gen chuyển còn được thử bằng các phép thử chỉ thị như thử tính kháng kháng sinh, thử tính diệt sâu nhưng ở qui mô phòng thí nghiệm và qui mô nhà lưới.

Điểm tiếp theo là phải xác định phương thức và đặc điểm di truyền của gen chuyển và tính trạng được gen chuyển mã hóa đồng thời kiểm tra mức độ đồng hợp tử của thể hệ con cái chúng bằng cách lai chéo hay tự phối và phép thử tính kháng kháng sinh.

2.2.4. Thử nghiệm trên đồng ruộng và đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen

Cây chuyển gen sau bước đánh giá ở mức độ phòng thí nghiệm cần phải kiểm tra mức độ an toàn trên đồng ruộng, mức độ an toàn đối với sức khỏe vật nuôi, con người và khả năng ảnh hưởng lên môi trường. Qui định chung khi thử trồng cây chuyển gen trên đồng ruộng cần phải nắm được các thông tin cơ bản sau:

- Gen được chuyển có nguồn gốc từ đâu? được chuyển vào cây trồng thông qua vector nào? và được chuyển kèm những gen gì?.
- Gen chuyển hoạt động trong điều kiện nào? Sản phẩm tạo ra là gì?.
- Gen được chuyển và gen chuyển kèm có thể bị phát tán (chuyển sang cây khác) của hệ sinh thái trong khu vực thông qua hạt phấn của cây chuyển gen hay không ? Nếu có thì nguy cơ gì xảy ra?.
- Sản phẩm của gen chuyển có gây những thay đổi cơ bản về chất đối với sản phẩm nông nghiệp được sản xuất ra bằng giống cây chuyển gen hay

không?.

- Chất (protein) do gen chuyển tạo ra có gây dị ứng cho người và vật nuôi sử dụng chúng hay không? Cần tiến hành kiểm tra độc hại theo qui định hiện hành của ngành y tế.

2.3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Vật liệu

2.3.1.1. Vật liệu sinh học

Các giống cây trồng thuộc các nhóm cây không làm lương thực như bông vải, cây trồng rừng, cây hoa cảnh và nhóm cây lương thực, trong đó có:

Giống bông vải bao gồm các giống trong tập đoàn giống, các giống đang dùng trong sản xuất đại trà (TM1, VN36P, 254, SB1, C118, LRA, SSR, Cooker) và các dòng bông chuyển gen kháng sâu cryIA(c) được sử dụng để xây dựng phương pháp đánh giá cây chuyển gen do Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi Nha Hố, Ninh Thuận cung cấp.

Cây trồng rừng: chỉ có cây hồng được chọn vì đây là loài cây mọc nhanh, có chất lượng gỗ tốt, nhưng lại dễ bị sâu ăn lá phá hoại.

Cây cảnh chỉ chọn đối tượng là hoa cúc được nuôi cấy trong điều kiện in vitro.

Cây lương thực: Lấy đối tượng là các giống lúa thuộc loài phụ *indica* (IR64, KDML105, C71) và được sử dụng chuyển gen bằng máy bắn gen và thông qua *Agrobacterium*... và các dòng lúa chuyển gen *OAT*, *P5CS*, *TPS*, *nhaA* giống Taipei 309 để thử tính kháng sâu đục thân.

2.3.1.2. Các loại sinh phẩm, vật tư và hóa chất

Bộ sưu tập các gen và các chủng Agrobacterium được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào cây trồng có nguồn gốc từ các tổ chức KHCN quốc tế được chuyển giao cho Viện Công nghệ Sinh học thông qua Thỏa thuận chuyển giao nguyên vật liệu (MTA).

Chủng Bt AB51 có tính kháng sâu non bộ hà đã được Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện CNSH sàng lọc.

Các kháng thể kháng protein Cry, Vip2,3: Có nguồn gốc từ ICGB, New Dehli và Viện Công nghệ Sinh học sản xuất.

Các primer được tổng hợp dựa trên trình tự các gen nghiên cứu.

2.3.2. Phương pháp

2.3.2.1. Phân lập gen

Hai phương pháp chính được áp dụng trong đề tài này để phân lập gen. Đó là (i) Phân lập thông qua chức năng protein, dùng trong trường hợp tìm gen *vip* của vi khuẩn *Bt*. và (ii) phân lập gen dựa trên nhân bản bằng PCR.

(i) Phân lập thông qua chức năng protein

Trước hết phải tìm cho được loại phân tử có chức năng sinh học cần thiết. Trong trường hợp này là loại protein do tế bào vi khuẩn *Bt* sản sinh ra trong giai đoạn phát triển sinh dưỡng (vegetative), đã được xác định trước là có hoạt tính diệt côn trùng (insecticidal) viết tắt là nhóm gen *vip*. Thông qua phân tích trình tự amino acid được protein Vip tinh sạch được ta thiết kế mồi và tiến hành nhân gen hoặc nhân một số đoạn dò đánh dấu để lai tìm trong thư viện ADN genom để tìm ra gen.

(ii) Phân lập gen dựa trên nhân bản bằng PCR

Tìm trên mạng trình tự đã công bố, thiết kế primer và nhân dòng bằng DNA của đối tượng ta quan tâm, so sánh trình tự và thiết kế vào vector để sử dụng. Kỹ thuật này là kỹ thuật phân lập gen bằng PCR.

Công việc tiếp theo là thiết kế đoạn gen phân lập được vào vector thích hợp bao gồm gen chỉ thị, gen chọn lọc, đoạn promoter và đoạn terminator cần thiết cho chuyển gen vào thực vật. Nhóm vector thích hợp nhất hiện nay là vector do CAMBIA, Úc cung cấp.

2.3.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây trồng

- Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy mô tế bào và tái sinh cây trên các đối tượng nghiên cứu.
- Tiến hành nhiễm mẫu nuôi với vi khuẩn *Agrobacterium*, diệt khuẩn và chọn dòng mô sẹo, tái sinh cây.
- Tối ưu hóa điều kiện nhiễm gen và tái sinh cây để thu được hiệu quả tái sinh cao và tỷ lệ chuyển gen thích hợp.
- Tiến hành trồng cây bông và thực hiện vi tiêm giai đoạn sau thụ phấn 12-24 giờ.
- Tạo rễ và chuyển cây ra ngoài đất.
- Kết hợp nhân in vitro một số dòng có triển vọng.

2.3.2.3. Phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở qui mô phòng thí nghiệm và nhà lưới

- Tiến hành sàng lọc cây chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh chọn lọc.
- Sàng lọc cây chuyển gen bằng phản ứng PCR gen chuyển.
- Lai Southern giữa mẫu DNA dò với DNA genom cây chuyển gen xác định số lượng bản gen chuyển trong genom cây nhận.
- Lai Northern giữa mẫu dò với RNA cây chuyển gen.
- Lai Western giữa protein cây chuyển gen với kháng thể đặc hiệu.
- Trồng cây thu hạt đối với cây nhận giống bằng hạt, thử kháng sinh để đánh giá mức độ đồng hợp tử của gen chuyển.

2.3.2.4. Phương pháp thử nghiệm trên đồng ruộng và đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen

- Trồng cách ly và phân tích di truyền mức độ phát tán phấn hoa nếu có đối với cây trồng 1 năm.
- Đánh giá hoạt tính gen chuyển bằng phép thử sinh học về tính kháng sâu, kháng bệnh.
- Thử độc tính và tính gây dị ứng của protein gen chuyển theo qui định của Bộ Y tế.

2.3.3. Dạng sản phẩm kết quả tạo ra

- Có bộ sưu tập các gen có giá trị dùng để chuyển vào cây trồng như *cryIA(b,c)*, *anti-ACO*, *GNA*, *Xa21*, *TPS*, *P5CS*, *OAT*, *nhaA*,...
- Các dòng cây chuyển gen có giá trị làm giống hoặc sử dụng làm nguyên liệu lai hữu tính tiếp theo.
- Qui trình kỹ thuật chuyển gen vào cây trồng thông qua *Agrobacterium* và vi tiêm.
- Qui trình kỹ thuật chuyển gen vào cây trồng sử dụng vector chọn lọc tích cực không dùng gen kháng kháng sinh.
- Các phương pháp phân lập và thiết kế gen đạt trình độ quốc tế.
- Qui phạm đánh giá cây chuyển gen gồm các bước trong phòng thí nghiệm và trong nhà lưới an toàn.

2.3.4. Nhu cầu kinh tế - xã hội và địa chỉ áp dụng

Tạo được những qui trình kỹ thuật nền về chuyển gen ở cây trồng, các qui phạm cơ bản về đánh giá cây trồng chuyển gen góp phần phát triển lĩnh vực khoa học tạo giống và năng lực quản lý nhà nước về an toàn sinh học đối với sinh vật chuyển gen.

Đưa công nghệ tạo cây chuyển gen thành một công cụ hỗ trợ đắc lực cho công tác tạo giống truyền thống, đồng thời nâng cao năng lực tiếp cận các lĩnh vực khoa học hiện đại trong lĩnh vực tạo giống và khoa học cây trồng nói chung. Đưa nền khoa học nước ta từng bước hội nhập khu vực và quốc tế trên các lĩnh vực về công nghệ sinh học thực vật nói chung và công nghệ sinh học cây trồng nói riêng.

Rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả công tác tạo giống cây trồng đặc biệt đối với những cây trồng đòi hỏi thời gian dài trong lai tạo giống. Giảm chi phí sản xuất khi không phải dùng nhiều thuốc trừ sâu, hóa chất bảo vệ thực vật, đồng thời đảm bảo sức khỏe cho con người và bảo vệ môi trường. Giảm chi phí bảo vệ thực vật, hạ giá thành nông sản, tăng thu nhập cho người nông dân.

Đa dạng hóa sản phẩm, kéo dài tuổi thọ sản phẩm, mở rộng thị trường (hoa tươi, quả nhiệt đới), tạo thêm công việc cho nông dân, góp phần chuyển dịch cơ cấu trong sản xuất nông nghiệp.

Đưa nước ta hội nhập bình đẳng vào trào lưu phát triển nông nghiệp công nghệ cao của khu vực và thế giới thông qua giảm sử dụng hóa chất và tăng cường chất lượng sản phẩm.

CHƯƠNG 3. NHỮNG NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN

3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN

3.1. Kết quả phân lập gen

3.1.1. Kết quả phân lập gen *vip*

3.1.1.1. Giới thiệu về gen *vip*

3.1.1.2. Phát hiện protein *Vip 2*, *Vip 3* bằng lai miễn dịch

3.1.1.3. Kết quả tinh chế protein *Vip 2*

3.1.1.4. Kết quả phân lập gen *Vip 3* và thiết kế vector chuyển gen

3.1.2. Kết quả xây dựng thư viện gen từ chủng *Bacillus thuringiensis* AB51 có hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà

3.1.2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.1.2.2. Kết quả và thảo luận

3.1.3. Phân lập gen *Pi-2(t)* kháng bệnh đạo ôn

3.1.3.1. Căn cứ khoa học và thực tiễn của việc tìm kiếm gen kháng đạo ôn

3.1.3.2. Kết quả phân lập gen *Pi-2(t)* và thảo luận

3.1.3.3. Kết luận về phân lập gen *Pi_2(t)*

3.1.4. Kết quả phân lập gen *Pi-1(t)* kháng đạo ôn

3.1.1. Kết quả phân lập gen *vip*

3.1.1.1. Giới thiệu về gen *vip*

Ngoài các nghiên cứu về gen *cry* tạo độc tố trong pha sinh bào tử của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* còn có nhiều hướng nghiên cứu mới về gen *vip*. Gen *vip* mã hoá các protein trong pha sinh dưỡng trong chu trình phát triển của vi khuẩn *Bt* và *Bc* có hoạt lực diệt côn trùng và có phổ tác dụng mạnh hơn các protein độc do gen *cry* mã hóa (Edmonds & CS, 1996).

Một số gen *vip* như *vip1*, *vip2*, *vip3* đã được nghiên cứu sâu về mặt phân tử và khả năng biểu hiện protein độc tố ở nhiều chủng khác nhau và các gen đó đã được nhân dòng thành công bằng kỹ thuật PCR. Protein *Vip3* có kích thước khoảng 88,6kDa, có hoạt tính kháng sâu xám (*Agrotis ypsilon*) cao gấp 260 lần so với protein *CryIA* và có phổ hoạt động rộng kháng một số loài côn trùng Bộ Cánh vẩy như sâu xám, sâu cắn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*) và sâu xanh hại ngô (*Helicoverpa zea*) (Li & CS, 1996).

Cơ chế tác dụng độc của các loại protein *Vip* đã được nghiên cứu và bước đầu

cho thấy giống như phương thức tác dụng của tinh thể độc δ - endotoxins. Tuy nhiên protein Vip có hoạt lực sau 48 - 72 giờ từ khi ăn protein độc, trong khi đó đối với protein Cry là 16 - 24 giờ (V.A. Doss & CS, 2002).

Gần đây, đã có các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động, hoạt lực diệt côn trùng, phổ tác dụng của gen *vip* để tiến tới phân lập và thiết kế tạo vector chuyển gen vào thực vật. Theo các nhà khoa học việc tìm ra các gen *vip* có hoạt tính diệt côn trùng mạnh và ứng dụng để tạo ra cây chuyển gen có tính kháng sâu và có phổ tác động rộng hơn là vấn đề đang quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới.

3.1.1.2. Phát hiện protein Vip2, Vip3 bằng lai miễn dịch

a) Kết quả lai miễn dịch protein dịch nổi của Bt với kháng thể kháng protein Vip2

Protein Vip là protein độc tố có hoạt lực diệt côn trùng mạnh và được tạo ra ở thời kì sinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn Bt và vi khuẩn Bc. Đã có một số công trình nghiên cứu về trình tự, cấu trúc cũng như hoạt tính và phổ diệt sâu của protein Vip. Tuy nhiên, các công bố chỉ chủ yếu tập trung về các protein Vip có hoạt tính diệt sâu thuộc Bộ Cánh vẩy và Bộ Hai cánh. Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là sàng lọc protein có hoạt tính diệt sâu non bộ hà hại khoai lang (*Cylas formicarius*) thuộc Bộ Cánh cứng.

M 2 3 4 5 6 7



Hình 1. Kết quả phản ứng lai miễn dịch với kháng thể kháng protein Vip2

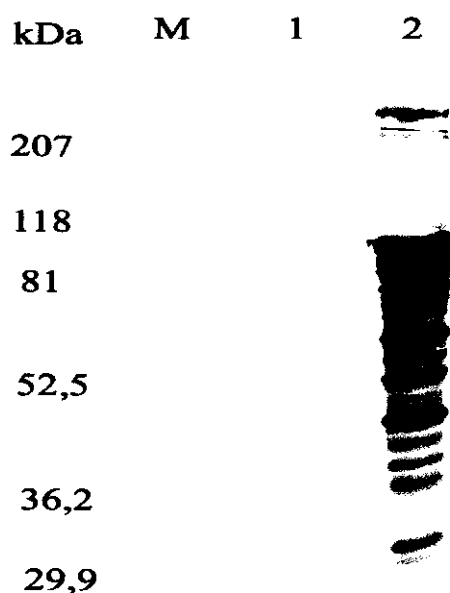
Đường chạy số 1: Marker; Đường chạy số 4: Thang protein chuẩn; Đường chạy số 5: Phản ứng Western-Blotting của protein dịch nổi BtAB75; Đường chạy số 7: Phản ứng Western-Blotting của protein.

Theo kết quả nghiên cứu trước, chúng tôi đã sàng lọc được chủng BtAB51 có hoạt lực diệt sâu non bộ hà chỉ sau 18 giờ nuôi cấy. Điều này chứng tỏ có sự xuất hiện của protein độc tố ở thời kỳ tế bào sinh dưỡng. Hơn thế nữa, sau khi tách chiết protein ngoại độc tố và tiến hành lai miễn dịch với một số kháng thể kháng

protein độc (kết quả thực hiện tại Syngenta, Mỹ), tác giả đã phát hiện được bằng protein có phản ứng dương tính với kháng thể kháng protein *Vip2* có kích thước khoảng 44kDa. Dựa vào các kết quả trên chúng tôi tiếp tục công việc nghiên cứu là tách chiết và tinh chế phân đoạn 44kDa bằng sắc kí trao đổi ion, lọc gel và tiến hành thử hoạt lực diệt sâu phân đoạn khoảng 44kDa (Nguyễn Trung Nam & CS, 2001). Và tiến tới xác định trình tự của một số axit amin trên hệ thống khối phổ QSTAR® XL tại Viện Công nghệ Sinh học để thiết kế probe (Hình 1).

b) Kết quả lai miễn dịch với kháng thể kháng protein *Vip2*

Sau khi phân tách protein ngoại bào của chủng BtAB51 được cố định trên màng, lai với kháng thể đa dòng thứ nhất kháng protein *Vip3V* nhận được từ TS. Raj Bhanagtan, phòng Côn trùng, Trung tâm Quốc tế về Công nghệ Sinh học và Kỹ thuật Di truyền, New Delhi, Ấn Độ. Tiếp đó lai với kháng thể thứ 2 được cộng hợp với enzym horseradish peroxidase (HRP) của hãng Bio-rad và phát hiện bằng nhuộm BCIP/NBT và kết quả được trình bày trên Hình 2.



Hình 2. Kết quả phản ứng Western-Blotting của protein *Vip3* với kháng thể kháng *Vip3*

M: Thang protein chuẩn; Đường chạy số 1: Phản ứng Western-Blotting của protein dịch nổi BtAB51; Đường chạy số 2: Phản ứng Western-Blotting của protein *Vip3* với kháng thể kháng *Vip3*

Kết quả thu được bằng protein khoảng 89kDa xuất hiện ở mẫu protein đối chứng dương còn ở mẫu protein dịch nổi ở chủng BtAB51 thấy xuất hiện 1 vạch đặc hiệu nhưng với kích thước nhỏ hơn, khoảng 86kDa. Điều này tạm thời kết luận rằng protein thuộc họ *Vip* cũng có mặt ở chủng BtAB51. Tuy nhiên theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi thì phân đoạn có hoạt tính diệt sâu non bộ hà khoai lang

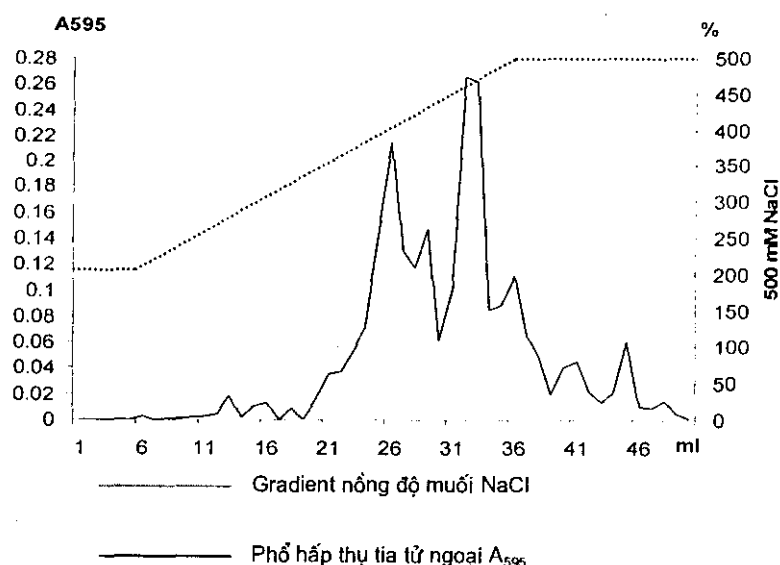
có kích thước ~ 44kDa và có biểu hiện dương tính với kháng thể kháng protein Vip2 (Nguyễn Trung Nam & CS). Như vậy, phổ diệt sâu của protein quan tâm này khác với phổ diệt sâu của protein Vip3 vì nó có khả năng tiêu diệt sâu non bọ hà thuộc Bộ Cánh cứng. Trong khi theo công bố của Li và CS protein Vip3A có khả năng diệt rất nhiều loại sâu đặc biệt là sâu thuộc Bộ Cánh vảy và Hai cánh (Li & CS, 1996).

Việc phát hiện ra một protein khác cùng họ với protein Vip3 ở chủng *BtAB51* cũng đưa ra một hướng nghiên cứu mới vì hiện nay, các gen Vip với phổ tác động rộng và hoạt lực diệt côn trùng mạnh đang được rất nhiều phòng thí nghiệm quan tâm. Cụ thể hiện nay công ty Syngenta ở Mỹ đã tiến hành trồng thử nghiệm cây bông chuyển gen *vip3* trên diện rộng và cây bông này có khả năng kháng sâu miệng nhai hại bông như sâu xanh da láng, sâu keo, sâu hồng...

3.1.1.3. Kết quả tinh chế protein Vip2

a) Kết quả sắc kí trao đổi ion

Sắc kí trao đổi ion là phương pháp thường được sử dụng để tinh sạch protein, đặc biệt là từ dịch chiết thô. Khi đã biết được tính chất lí hóa và điểm đẳng điện (pI) của protein cần tách thì việc tinh chế có thể các protein mới chưa có nhiều công bố thì thí nghiệm về sắc kí trao đổi ion được tiến hành để có thể bộc lộ một số đặc tính sinh lý của protein và từ đó đưa ra các chiến lược tinh sạch tiếp theo.



Hình 3. Sắc ký đồ protein ngoại bào BtAB51 từ cột Resource Q 1 ml trên hệ FPLC

Protein ngoại bào được tách chiết và rửa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà được thẩm tích loại muối, lọc qua màng lọc và được nạp thẳng vào cột Resource_Q_1_ml trên hệ

FPLC (Pharmacia-Biotech). Các tạp chất được rửa bằng đệm Tris 50 mM pH 7,4 cho đến khi A_{595} trở lại đường nền và protein được thổi ra khỏi cột bằng gradient nồng độ 0-0,5M NaCl. Các phân đoạn protein thu được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Phổ sắc kí và kết quả kiểm tra điện di SDS-PAGE được thể hiện trên Hình 3.

Hình 3 là phổ sắc kí cho mẫu protein ngoại bào thu được từ 300ml dịch nuôi cấy *BtAB51*. Trên phổ có hai đỉnh chính hấp phụ cho protein (đỉnh I và đỉnh II). Với lưu lượng dòng chảy khi thổi protein ra khỏi cột là 0,5ml/phút thì sau khoảng 45 phút thấy xuất hiện protein. Đỉnh I ứng với các phân đoạn 22 - 30 và được thổi ra khỏi cột với nồng độ 350 - 400mM NaCl. Đỉnh II tương ứng với các protein ở phân đoạn từ 31 - 34 và được thổi ra với nồng độ 400 - 450mM. Phổ hấp phụ A_{595} của phân đoạn ở đỉnh II cũng cao hơn phân đoạn ở đỉnh I.

Kết quả kiểm tra các phân đoạn của hai đỉnh hấp phụ protein bằng điện di SDS-PAGE cũng cho thấy hai đỉnh là hai phổ hấp phụ của protein khác nhau. Các phân đoạn ở đỉnh II (đường chạy số 1,2) cho thấy xuất hiện nhiều băng với kích thước khác nhau, tuy nhiên lượng protein tập trung vào hai băng chính trong đó có một băng protein quan tâm kích thước trong khoảng 44kDa. Còn các phân đoạn protein ở đỉnh I (ở đường chạy số 3, 4, 5) cũng cho thấy xuất hiện 1 vạch protein có kích thước trong khoảng 42 - 44kDa. Dựa vào kết quả thử hoạt lực diệt sâu ở hai đỉnh và các kết quả nghiên cứu trước của Nguyễn Trung Nam & CS (2001), chúng tôi thu các phân đoạn protein nằm trong đỉnh I để tiếp tục sắc kí lọc gel.

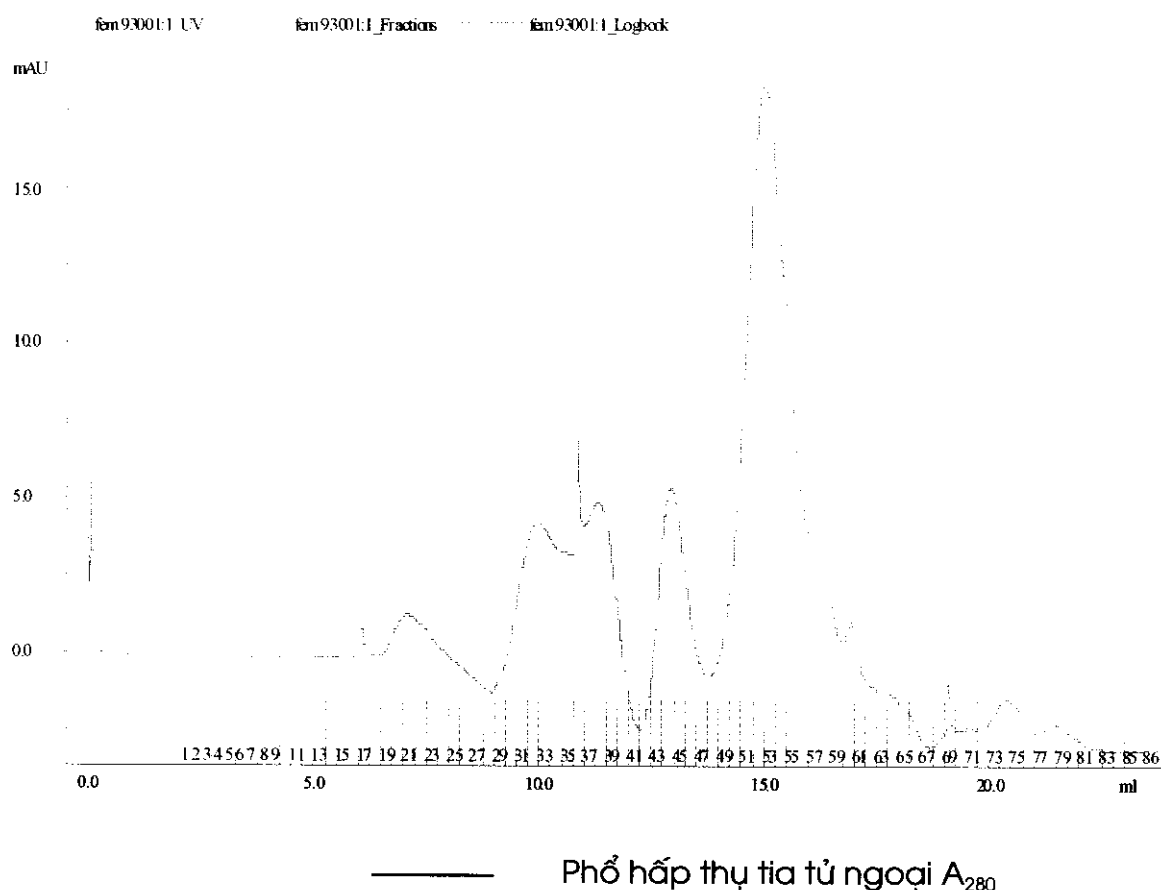


Hình 4. Điện di SDS-PAGE của các phân đoạn protein tinh chế sau sắc kí trao đổi ion

Đường M: Thang protein chuẩn; Đường chạy số 1-2: các phân đoạn protein ở đỉnh II; Đường chạy số 3-5: các phân đoạn protein ở đỉnh I. Đường chạy số 6: Mẫu protein ngoại bào.

b) Kết quả sắc kí lọc gel

Theo kết quả chạy điện di SDS-PAGE và kết quả thử hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà, các phân đoạn sau sắc kí trao đổi anion cho thấy chỉ các phân đoạn trong khoảng từ 31- 35ml có mang đoạn protein có kích thước nằm trong khoảng 44kDa là có hoạt tính diệt sâu. Do vậy chúng tôi tổng hợp các phân đoạn này, cô đặc mẫu để tiếp tục sắc kí lọc gel. Mẫu sau khi cô đặc được nạp thẳng lên cột Superose 12 trên hệ FPLC. Các protein trên tiếp tục được phân đoạn và thổi ra khỏi cột bằng đệm Tris 50mM pH 7,4. Thu các phân đoạn và kiểm tra bằng SDS-PAGE. Phổ sắc kí và kết quả kiểm tra điện di SDS-PAGE được thể hiện ở Hình 5.



Hình 5. Sắc kí đồ lọc gel mẫu protein ngoại bào BtAB51 từ cột Superose 12 trên hệ FPLC

Kết quả sắc kí đồ thu được 3 đỉnh hấp phụ protein. Tuy nhiên, theo kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy chỉ có các phân đoạn khoảng 15 -17ml mang protein kích thước 44kDa . Do vậy chúng tôi đã thu các phân đoạn nằm trong khoảng này để thử hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà và đồng thời tiến hành đọc trình tự để thiết kế probe.

c) Kết quả kiểm tra hoạt lực diệt côn trùng của các phân đoạn protein

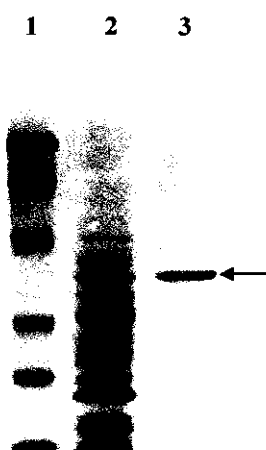
Các phân đoạn protein thu được sau khi sắc kí trao đổi ion cũng được tiến

hành thử hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà tuổi 2. Chúng tôi tiến hành lấy một số phân đoạn protein ở hai đỉnh để thử hoạt tính diệt sâu cùng với đối chứng dương là protein ngoại bào của chủng *BtAB51* và đối chứng âm là đệm sắc kí (50mM Tris - Cl pH 7.4, 300mM NaCl). Hàm lượng protein của mỗi phân đoạn được xác định theo phương pháp Bradford và CS (1971) sao cho lượng protein ở mỗi giếng là 1000ng. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần, và mỗi lần thử 5 ấu trùng bọ hà cho mỗi phân đoạn.

Bảng 2. Hoạt lực diệt côn trùng của các đỉnh protein sau khi sắc kí trao đổi anion

Thứ tự đỉnh protein	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn protein có hoạt lực diệt sâu	
		Lần thử 1	Lần thử 2
I	4	1	2
II	3	3	3

Kết quả bảng trên cho thấy hoạt lực diệt sâu cao của các phân đoạn thuộc đỉnh II có thể được giải thích do mang nhiều protein có kích thước 42 - 44kDa (Hình 6). Điều này càng được khẳng định khi chúng tôi tiến hành thử hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà tuổi 2 với các phân đoạn có kích thước khoảng 44 kDa thu được sau khi sắc kí lọc gel.



Hình 6. Sắc kí đồ lọc gel mẫu protein ngoại bào *BtAB51* từ cột Superose 12 trên hệ FPLC

Để xác định ngưỡng gây chết, chúng tôi đã thử hoạt lực diệt sâu tại phân đoạn protein sau sắc kí lọc gel có kích thước 44kDa (Hình 6) ở các nồng độ protein khác nhau 100 - 750ng/giếng thức ăn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi lần thử 5 ấu trùng bọ hà tuổi 2, quan sát mỗi ngày và nhận thấy sâu chết sau 5 - 6 ngày khi ăn độc tố. Kết quả được thể hiện ở bảng 2, với hàm lượng protein cao từ 500 - 750 ng/giếng, tỷ lệ sâu chết trung bình lớn hơn 90% so với đối chứng là 7%. Với nồng độ 200ng/giếng thức ăn tỷ lệ sâu chết khá cao nhưng không đồng đều: như lần thử sâu thứ 2 là 40%, nhưng ở lần thử sâu tiếp theo là 80%. Điều này có

thể giải thích rằng trong trường hợp sâu ăn ít thức ăn thì lượng độc tố chưa đủ làm cho sâu chết.

Thực tế nghiên cứu, tỷ lệ của ấu trùng chết không đồng đều khi tiến hành thử nghiệm cùng một nồng độ độc tố còn phụ thuộc rất nhiều vào cách bố trí, thao tác thí nghiệm, môi trường nuôi sâu và chất lượng ấu trùng đem thử. Theo một số nghiên cứu của Sylvain và CS (2002), khi tiến hành thí nghiệm thử protein độc với sâu xám (*Agrotis ypsilon*) các tác giả đã xác định trọng lượng của sâu trước và sau khi thí nghiệm với kích thước ấu trùng ban đầu là 30 - 40mm. Tuy nhiên, trong thí nghiệm của chúng tôi, do ấu trùng bọ hà tuổi 2 rất nhỏ, kích thước cơ thể dài khoảng 6 - 7mm nên việc thao tác gặp rất nhiều khó khăn, vì vậy chúng tôi chỉ quan sát sự phát triển của ấu trùng bằng hình thái bên ngoài. Do vậy dựa theo kết quả đã thu được ở Bảng 3, chúng tôi tạm kết luận protein tinh chế có hoạt lực diệt sâu và có ngưỡng gây chết nằm trong khoảng 200ng/ 200 μ l thức ăn.

Bảng 3. Hoạt lực diệt côn trùng của phân đoạn protein có kích thước 44 kDa tách chiết từ chủng BtAB51 với ấu trùng bọ hà tuổi 2

Hàm lượng protein (ng/giếng)	Hoạt lực diệt sâu của phân đoạn protein (%)		
	Lần thử 1	Lần thử 2	Lần thử 3
0	0	0	20
100	0	20	0
200	60	40	80
500	100	80	100
750	100	-	-

Chú thích: - : không tiến hành thí nghiệm

Trong khi theo nghiên cứu của E.Schnepf (1998), khi thử hoạt lực diệt sâu của protein *Vip3A* với sâu xám tuổi 3 (*Agrotis ypsilon*) thì ngưỡng gây chết nằm trong khoảng 200ng/cm² (E.Schnepf & CS, 1997). Selvapandian và CS khi thử hoạt lực diệt sâu của protein *vip3V* với các loại sâu khác nhau thuộc Bộ Cánh vảy có nồng độ chết trung bình (LC₅₀) dao động trong khoảng từ 5-2000ng/cm² (Selvapandian & CS, 2001).

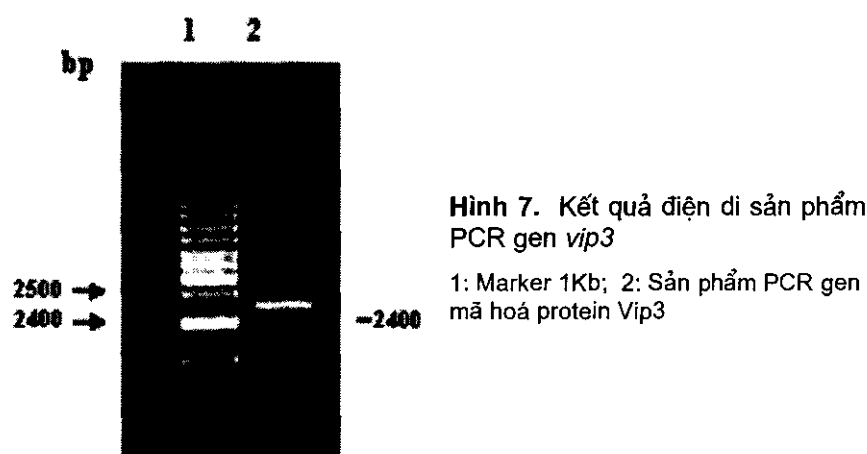
3.1.1.4. Kết quả phân lập gen *vip3* và thiết kế vector chuyển gen

a) Nhân gen mã hóa protein *Vip3* bằng kỹ thuật PCR

Dựa vào những kết quả nghiên cứu trước, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR để xác định sự có mặt và nhân bản gen *vip3* với ADN khuôn chính là ADN tổng số của chủng BtAB51. Dựa vào trình tự gen *vip3A* công bố trong ngân hàng gen NCBI (kí hiệu AY295778), chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu V2.1 và V2.2 để nhân gen *vip3*. Hai mồi này có trình tự và các thông số cần thiết như sau:

STT	Trình tự mỗi	Tm	%GC	Vị trí gắn
V2.1	5'-GCGGATCCATGAACAATAATACTAA-3'	61° C	32,2	1-20
V2.2	5'-CGGAGCTCTTACTTATATGAGACATCGTA-3'	62,5° C	41,5	2349 - 2370

Đặc biệt để phục vụ cho việc thiết kế vector chuyển gen sau này, chúng tôi thiết kế thêm trên cặp mồi điểm cắt của 2 enzym giới hạn là *Bam*HI và *Sac*I. Nếu trong hệ gen của chủng *Bt*AB51 có mang gen *vip3* và phản ứng PCR xảy ra đặc hiệu thì theo lý thuyết chúng tôi sẽ thu được một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 2400bp.



Kết quả điện di trên cho thấy đoạn ADN mã hóa protein Vip3 đã được nhân lên một cách đặc hiệu, chỉ tạo ra một sản phẩm duy nhất, không có các sản phẩm phụ. Đối chiếu với thang ADN chuẩn, chúng tôi thấy kích thước sản phẩm PCR khoảng 2400bp. Kích thước này hoàn toàn phù hợp với kích thước gen *vip3* chúng tôi dự tính.

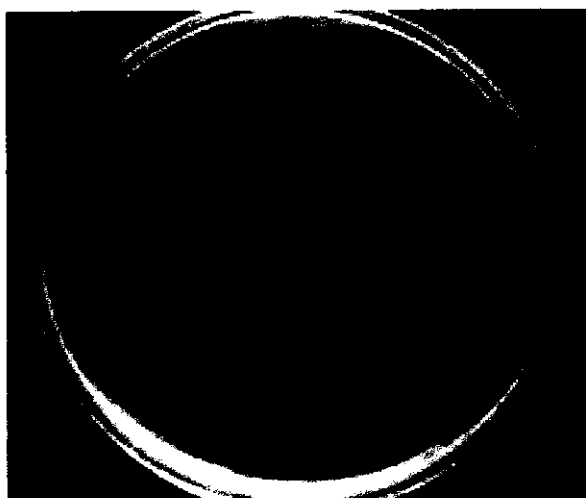
Theo kết quả trên, chúng tôi sơ bộ kết luận đã nhân được gen *vip3* từ ADN tổng số của chủng *Bt*AB51. Để có kết luận chính xác chúng tôi tiến hành tách dòng và đọc trình tự gen *vip3*.

b) Tách dòng gen mã hóa protein Vip3

Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR và vector tách dòng pCR2.1-TOPO. Phản ứng gắn dựa vào sự hình thành liên kết photphodiester giữa sản phẩm PCR và vector tách dòng pCR[®]2.1-TOPO được cung cấp ở dạng mạch thẳng có bazơ Thymine nhô ra ở đầu 3'. Do đặc tính của Taq-polymerase nên sản phẩm PCR có đến hơn 70% là có thêm bazơ Adenin ở đầu 3' do vậy việc liên kết giữa gen và vector có hiệu quả cao.

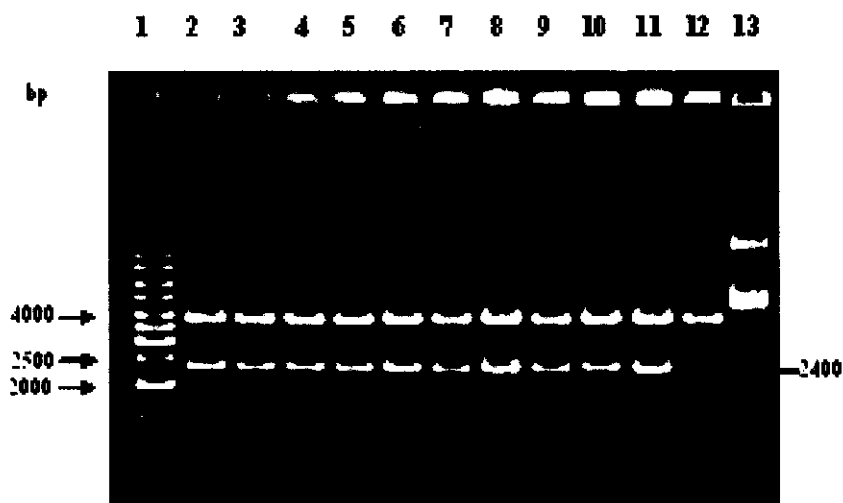
Hỗn hợp của phản ứng nối ghép được ủ ở nhiệt độ phòng khoảng từ 20-30

phút. Sản phẩm nối ghép sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E.coli* DH5 α và được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung Ampicillin (100 μ g/l), X-gal (100 μ g/ml) và chất cảm ứng IPTG 0,1M. Kết quả chúng tôi thu được cả khuẩn lạc xanh và khuẩn lạc trắng. Các khuẩn lạc xanh là do trong vector pCR[®]2.1-TOPO có chứa gen *lacZ* nếu hoạt động bình thường sẽ tổng hợp enzym β -galactosidase và dưới sự cảm ứng của IPTG chuyển hóa cơ chất X-gal thành hợp chất có màu xanh. Các khuẩn lạc trắng là do gen *lacZ* đã bị một đoạn ADN xen vào giữa dẫn đến không tổng hợp được enzym β -galactosidase.



Hình 8. Kết quả biến nạp sản phẩm ghép nối vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5 α

Các khuẩn lạc xanh: không chứa gen *vip3*; Các khuẩn lạc trắng: có thể mang gen *vip3*



Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid bằng *EcoRI*

1: Marker 1Kb; 2-11: Các plasmid tách từ khuẩn lạc trắng được cắt bằng *EcoRI*; 12: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh được cắt bằng *EcoRI*; số 13: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng đối chứng không cắt của mẫu số 2

ADN plasmid tách chiết từ khuẩn lạc trắng được điện di trên gel agarose 0.8% và được cắt kiểm tra bằng enzym *EcoRI*. Sở dĩ chúng tôi sử dụng *EcoRI* vì trong vùng đa nối của pCR[®]2.1-TOPO có hai vị trí nhận biết của enzym này mà trên

đoạn ADN ngoại lai không có.

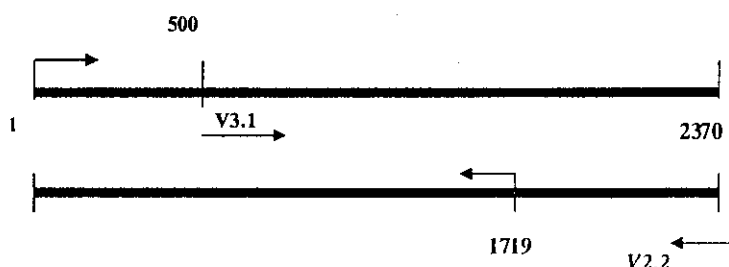
Kết quả điện di sản phẩm cắt ở hình 9 cho thấy các plasmit tái tổ hợp được tách từ khuẩn lạc trắng sau khi được cắt bằng *EcoRI* cho ra 2 băng ADN có kích thước khác nhau. Băng ở phía trên nằm ngang bằng với plasmit tách từ khuẩn lạc xanh cũng được cắt với enzym *EcoRI*. Băng ở phía dưới có kích thước khoảng 2400bp, tương đương với kích thước sản phẩm PCR của gen *vip3*. Như vậy có thể khẳng định là việc nối ghép sản phẩm PCR và vector tách dòng đã đạt được kết quả mong muốn.

c) Xác định trình tự gen *vip3*

Cuối cùng để xác định chính xác gen *vip3* đã được tách dòng bằng phương pháp đọc trình tự gen, chúng tôi chọn 3 mẫu trong số các mẫu plasmit tách từ khuẩn lạc trắng (ký hiệu V13, V14, V15) làm nguyên liệu cho phản ứng PCR xác định trình tự gen *vip3*. Trình tự gen được xác định theo cả chiều xuôi và chiều ngược trên máy xác định trình tự nucleotit tự động ABI PRISM[®]3100 Advant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystems cùng với bộ hoá chất sinh chuẩn BigDye[®] Terminator v3.1 của Perkin- Elmer. Do gen *vip3* có kích thước khoảng 2400 bp mà máy đọc trình tự tự động chỉ đọc chính xác trong khoảng 900 nucleotid từ điểm gắn mỗi vào phía trong gen. Vì vậy, chúng tôi thiết kế thêm cặp mỗi V3.1 và V3.2 để có thể đọc hết trình tự gen *vip3*. Trình tự cặp mỗi như sau:

Mỗi xuôi(V_{3.1}): 5'- CTGAATTACACCTGCGTAT-3'

Mỗi ngược(V_{3.2}): 5'-CTCCGTCCTTATGACATAT-3'



Hình 10. Sơ đồ đọc trình tự gen *vip3* với các mỗi V2.1, V2.2, V3.1, V3.2

Bảng 4. Kết quả xác định trình tự nucleotit của gen *vip3* ở 3 mẫu V13, V14 và V15

Mẫu	Chiều dài trình tự đã được xác định			
	Mỗi V2.1	Mỗi V2.2	Mỗi V3.1	Mỗi V3.2
V13	1290	1460	1203	1156
V14	1440	1450	1175	1195
V15	1280	1400	1167	1218

Rõ ràng, các đoạn ADN chúng tôi đọc được đã bao trùm toàn bộ chiều dài của gen *vip3* và một số đoạn ADN đã được đọc lặp lại. Sau khi ghép các đoạn trình tự đã đọc và xử lý qua phần mềm DNASTar, chúng tôi đã nhận được các trình tự gen hoàn chỉnh.

d) So sánh trình tự gen *vip3* với trình tự gen *vip3A* đã công bố

Với các kết quả đọc trình tự thu nhận được, chúng tôi sử dụng phần mềm DNASTar để:

- + So sánh các trình tự V13, V14, V15 với nhau và với trình tự gen *vip3* đã được công bố trong ngân hàng gen quốc tế.
- + Giải mã trình tự gen *vip3* sang trình tự protein tương ứng.
- + Xác định điểm cắt của enzym hạn chế trên gen *vip3* để phục vụ cho việc thiết kế vector chuyển gen sau này.

Sau khi thu nhận và xử lý 3 trình tự V13, V14 và V15, chúng tôi nhận thấy trình tự gen *vip3* ở dòng V15 ít sai khác nhất so với trình tự đã công bố. Chúng tôi quyết định sử dụng dòng V15 để làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

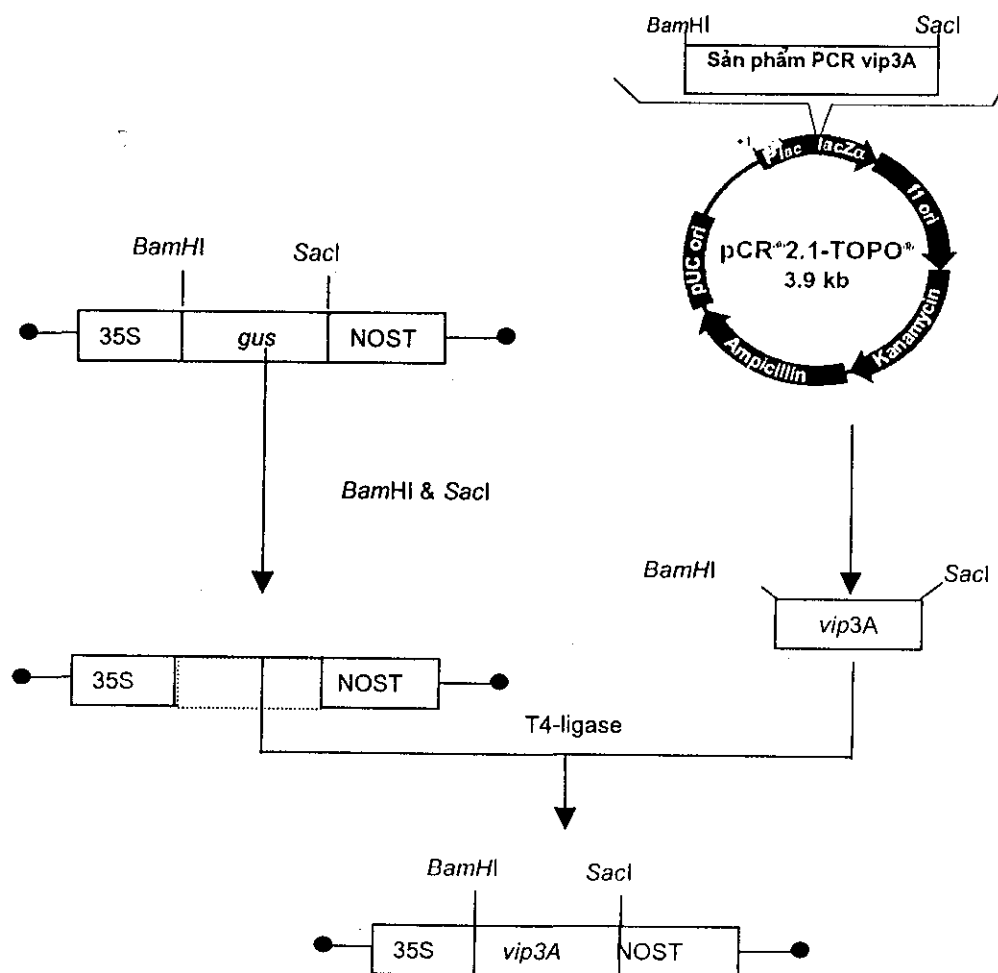
Kết quả cho thấy trình tự gen *vip3* có kích thước 2369bp, mã hoá 793 axit amin, trong đó đoạn gen có nghĩa bắt đầu bằng mã ATG của Methionin từ nucleotit thứ 9 và kết thúc bằng mã TAA ở nucleotit thứ 2378. Trình tự nhận biết của *Bam*HI nằm ngay đầu gen và trình tự nhận biết của *Sac*I nằm ở cuối gen. So sánh với trình tự gen *vip3A* được công bố trong ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi nhận thấy ở gen *vip3* chúng tôi phân lập được xuất hiện một đột biến thay thế Adenin bằng Guanin ở vị trí 1360 kéo theo sự thay thế axit Aspartic bằng Glycin trong trình tự axit amin của protein tương ứng. Chúng tôi nhận định rằng có thể đột biến này xảy ra do quá trình nhân bản ADN *in vitro* hoặc do sự sai khác về mặt di truyền giữa chủng *Bt*AB51 và chủng *Bt* mang gen *vip3A* do Wu và CS phân lập.

e) Thiết kế vector chuyển gen pBI121 mang cấu trúc 35S/*vip3*/NOST

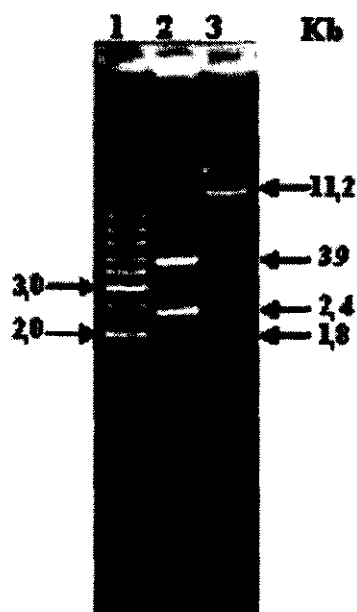
Vector pBI121 có kích thước 13kb được thiết kế dựa trên cấu trúc của vector pBIN19, là một vectơ chuyển gen vào thực vật. pBI121 mang một vị trí cắt duy nhất của *Bam*HI và *Sac*I ở hai đầu gen *gus* (β - *glucoronidase* gene = gen mã hóa cho β - Glucoronidase).

Plasmit tái tổ hợp ở dòng V15 cũng có vị trí cắt duy nhất của hai enzym *Bam*HI và *Sac*I nên chúng tôi tiến hành cắt đồng thời vector pBI121 và plasmit tái tổ hợp tách từ dòng V15 bằng *Bam*HI và *Sac*I. Theo dự đoán thì:

1. Sản phẩm cắt của pBI121 sẽ có hai băng tương ứng với kích thước khoảng 11,2 kb và 1,8kb (kích thước của gen *gus*);
2. Đối với dòng V15 cũng có hai băng khoảng 3,9kb (tương ứng với kích thước của vector pCR2.1 gốc) và 2,4kb (kích thước của gen *vip3*). Kết quả điện di trên Hình 12 cho thấy:
 - + đường chạy số 2 là kết quả cắt của plasmit dòng V15 tương ứng với kích thước khoảng 3,9 kb và 2,4 kb;
 - + đường chạy số 3 là sản phẩm cắt của pBI121 chỉ xuất hiện hai băng duy nhất, băng phía trên tương ứng với kích thước khoảng 11,2kb, băng phía dưới có kích thước khoảng 1,8kb. Các kết quả trên phù hợp với dự đoán lý thuyết và không có các băng phụ, điều này chứng tỏ kết quả cắt enzym tốt.



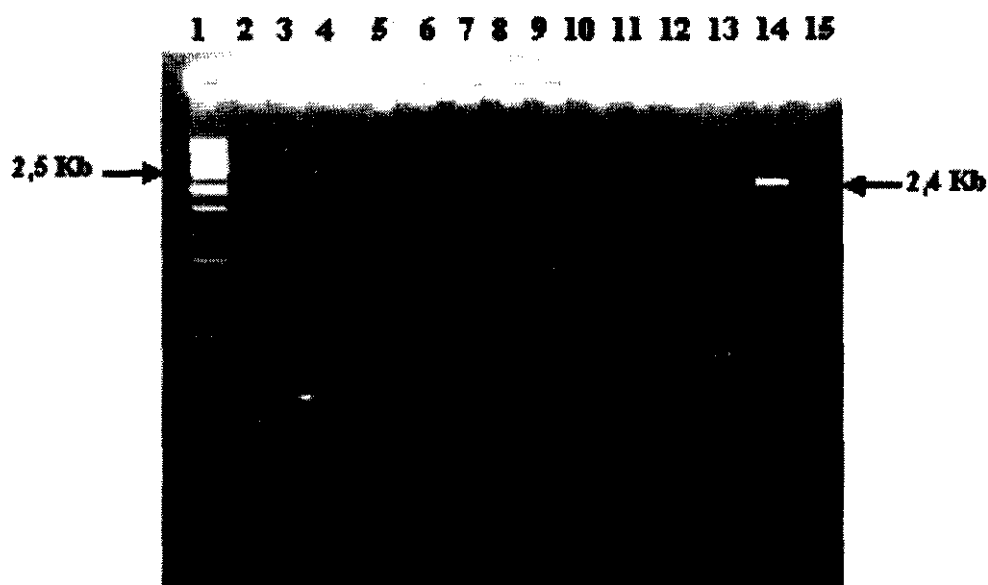
Hình 11. Sơ đồ thiết kế vector 35S/vip3A/NOST



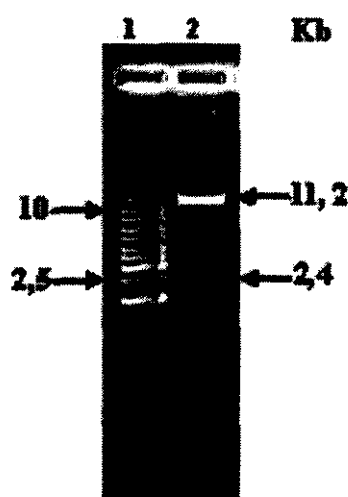
Hình 12. Sản phẩm cắt bằng *Bam*HI& *Sac*I

1: Marker 1Kb; 2: Vector tách dòng V15; 3: Vector pBI121

Sau đó, chúng tôi tiến hành thổi gel sản phẩm cắt của pBI121 là đoạn gel có kích thước 11,2kb và đoạn gen có kích thước 2,4kb (gen *vip3*) đối với sản phẩm cắt của vector tái tổ hợp dòng V15 để làm nguyên liệu cho phản ứng ghép nối bằng enzym T4 ligaza. Tiếp theo chúng tôi biến nạp sản phẩm ghép nối vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5α và ủ ở 37°C qua đêm. Để loại bớt các dòng dương tính giả, chúng tôi đã tiến hành PCR trực tiếp từ 8 dòng khuẩn lạc với hai cặp mồi khác nhau: i) cặp số 1 được thiết kế nằm trên vector pBI121; 2) cặp số 2 là cặp mồi đặc hiệu V12, V22 của gen *vip3*. Hơn nữa, chúng tôi sử dụng kết hợp hai cặp mồi này với mục đích có kết luận chính xác dòng khuẩn lạc nào mang gen *vip3*. Theo dự đoán kết quả nếu dòng khuẩn lạc nào có đoạn gen *vip3* đã được gắn vào vector thì đối với cặp mồi số 1 sẽ xuất hiện băng có kích thước lớn hơn 2,4kb vì ngoài kích thước của gen còn có thêm đoạn trình tự từ cặp mồi đến đoạn xen, còn đối với cặp mồi số 2 sẽ xuất hiện một băng có kích thước khoảng 2,4kb (tương ứng với độ dài của gen *vip3*). Dòng nào có kết quả PCR đối với cả hai cặp mồi số 1 và số 2 đúng theo dự đoán lý thuyết thì dòng đó mang vector pBI121/*vip3* tái tổ hợp mong muốn. Kết quả trên hình 13 cho thấy chỉ có duy nhất dòng số 5 xuất hiện băng có kích thước phù hợp theo lý thuyết với cặp mồi số 1 thể hiện ở đường chạy số 5 và cặp mồi số 2 là đường chạy số 14. Đồng thời kích thước của sản phẩm PCR với cặp mồi số 1 cũng lớn hơn cặp mồi số 2. Có thể kết luận rằng dòng số 5 mang cấu trúc vector pBI121/*vip3* tái tổ hợp.



Hình 13. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 8 dòng khuẩn lạc với 2 cặp mồi
2- 9: cặp mồi số 1 (nằm trên vector pBI121); 10-15: cặp mồi số 2 (nằm trên gen *vip3*)



Hình 14. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp với tổ hợp *Bam*HI & *Sac*I

1. Marker 1Kb; 2. pBI121/*vip3* cắt bằng *Bam*HI & *Sac*I

Để có kết luận chính xác dòng số 5 mang vector pBI121 tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi đã tiến hành tách plasmid của dòng số 5 để chuẩn bị cho phản ứng cắt kiểm tra bằng *Bam*HI và *Sac*I.

Tiếp theo, chúng tôi cắt plasmid tái tổ hợp tách được ở trên bằng *Bam*HI và *Sac*I. Theo dự đoán kết quả cắt sẽ xuất hiện 2 băng: i) băng thứ nhất có kích thước khoảng 11,2kb (kích thước của pBI121 đã được loại bỏ gen *gus*) và băng thứ 2 có kích thước 2,4kb (tương ứng với kích thước của gen *vip3*). Kết quả điện di sản phẩm cắt (Hình 14) trên đường chạy số 2 xuất hiện duy nhất hai băng có kích thước phù hợp với dự đoán lý thuyết. Điều này chứng tỏ chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen pBI121 tái tổ hợp mang cấu trúc 35S/*vip3*/NOST.

g) Kết luận về phân lập và thiết kế gen vip

1. Đã phát hiện được sự có mặt của protein *Vip2* và *Vip3* ở chủng *BtAB51* có hoạt lực diệt ấu trùng bọ hà.
2. Đã tách chiết và tinh chế được protein *Vip2* từ chủng *BtAB51* có hoạt lực diệt bọ hà. Phân đoạn này đang được xác định một số trình tự axit amin trên hệ thống khối phổ QSTAR® XL tại Viện Công nghệ Sinh học để thiết kế môi.
3. Sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi thiết kế đặc hiệu V2.1 và V2.2 đã phân lập được gen *vip3* từ ADN tổng số của chủng *Bacillus thuringiensis* AB51.
4. Đã xác định toàn bộ trình tự gen *vip3* bằng phần mềm DNASTAR. Gen *vip3* gồm 2369 nucleotit mã hóa 793 axit amin và có một đột biến thay thế Adenin bằng Guanin trên gen *vip3* ở vị trí 1360, làm thay đổi axit amin Aspartic thành Glycin trong trình tự protein tương ứng.
5. Đã thiết kế thành công được vector chuyển gen pBI121 mang cấu trúc 35s/*vip3*/NOST

3.1.2. Kết quả xây dựng thư viện gen từ chủng *Bacillus thuringiensis* AB51 có hoạt tính diệt ấu trùng bọ hà

3.1.2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng *Bacillus thuringiensis* AB51 do Syngenta cấp, đã được phòng Công nghệ Tế bào Thực vật sàng lọc và khẳng định có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang.

a) Tách chiết ADN tổng số của *Bt*

Qui trình: Hoà tan 10 đầu que cấy đầy tế bào vào 4ml TE có bổ sung 2mg/ml lysozym. Ủ ở 37°C trong 1 giờ, thêm proteinase K tới nồng độ 100µg/ml, ủ tiếp ở 37°C trong 1 giờ. Bổ sung urea 7M tới nồng độ 1M, EDTA tới nồng độ 50mM và SDS tới nồng độ 1%. Trộn đều mẫu sau mỗi lần thêm các chất ủ hỗn hợp trên ở 55°C qua đêm. Tách chiết 1 lần với phenol: chloroform (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), ly tâm 5 phút ở 4°C. Tủa dịch chiết bằng isopropanol (tỉ lệ 1:1) qua đêm. Ly tâm thu tủa 12000 vòng/phút 4°C, rửa cặn ADN 3 lần bằng cồn 70%. Để khô ADN ở nhiệt độ phòng, hoà tan trong TE, bảo quản ở 4°C.

Hoá chất: (1) Đệm tách ADN: TE (10 mM Tris- HCl (pH 8); 1 mM EDTA); Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 50mM pH 8; Proteinase K 100µg/ml; urea 1M; SDS 1%; (2) Phenol-chloroform (25:24); (3) Isopropanol

b) Xây dựng thư viện ADN genome

Các phương pháp được tiến hành theo qui trình trong các kit của hãng Stratagene:

- *Phương pháp xử lý ADN hệ gen Bt với enzym cắt hạn chế Sau3A*: Trong 100µl phản ứng có 55µl H₂O, 10µl đệm 10X, 10µl BSA 10X, 100 µl ADN (50ng/µl), 5µl enzym (10U/µl). Phản ứng được ủ ở 37°C, cứ sau 2 phút lấy 25µl ra đặt ngay lên đá để ngừng phản ứng. Điện di kiểm tra sản phẩm để xác định thời điểm cho nhiều phân đoạn ADN có kích thước khoảng 30 - 45kb.

- *Phương pháp xử lý vector*: Vector sử dụng là SuperCos 1 do hãng Stratagene cung cấp. Vector sau khi xử lý cắt mở vòng bằng *Xba*I, được khử gốc phosphat bằng CIAP để tránh sự đóng vòng trở lại, và cuối cùng được cắt bởi *Bam*HI để tạo ra các đầu dính thích hợp cho phản ứng ghép nối.

- *Phản ứng ghép nối các đoạn gen với vector*: Trong thể tích phản ứng 10µl gồm có: 1,5µl H₂O, 1µl đệm lại 10X, 4µl các đoạn gen cần gắn (ADN *Bt*) 25ng/µl, 2µl vector đã mở vòng (ADNscxib), 1µl rATP (10mM), 0,5µl enzym T4 ADN ligaza. Phản ứng được ủ qua đêm ở 12-16°C hoặc ủ 4° C trong 24h.

- *Phản ứng bao gói*: Qui trình: Bổ sung 4µl sản phẩm của phản ứng ghép nối vào 25µl dịch bao gói, đảo nhẹ nhàng tránh bọt khí. Ly tâm nhẹ, đảm bảo tất các thành phần đã được lắng xuống đáy ống. Phản ứng được ủ ở 22°C trong 24 giờ, tiếp theo bổ sung 500µl đệm SM. Thêm 20µl chloroform, đảo nhẹ nhàng, ly tâm nhẹ, đảm bảo tất cả các thành phần đã được lắng xuống đáy ống. Cuối cùng thu lấy dịch phía trên tránh lẫn chloroform. Bảo quản ở 4°C.

- *Phương pháp xâm nhiễm*: Pha loãng vector tái tổ hợp (được bao gói trong phage) bằng đệm SM tới tỉ lệ 1:10 và 1:50 bổ sung 25µl của mỗi dịch pha loãng trên với 25µl dịch tế bào XLI (OD₆₀₀ ~ 0.5) đã được xử lý để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm 200µl LB lỏng vào mỗi mẫu và ủ 1 giờ ở 37°C, cứ sau 15 phút lắc nhẹ một lần. Ly tâm 10 000 vòng/phút trong 5 phút. Hoà tan tế bào ở mỗi mẫu vào 50µl LB lỏng. Sử dụng que cấy tam giác cấy trải tế bào trên môi trường LB thạch có kháng sinh Amp nồng độ 50mg/l, ủ qua đêm ở 37°C và chọn lọc tế bào biến nạp.

- *Khuyếch đại thư viện gen*: Trộn dịch tế bào XLI (OD₆₀₀ ~0.5) với vector tái tổ hợp (được bao gói trong phage) với tỉ lệ 1:1 vào các eppendoft 2ml sao cho 5.000 cfu/1 ống. Ủ các ống ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm 4 thể tích của LB lỏng vào mỗi ống, nuôi lắc 200v/p, trong vòng 1h ở 37°C. Ly tâm 10 phút, tốc độ 10.000 vòng/phút. Hoà tan tế bào trong 10ml LB lỏng trải trên các đĩa thạch aga có chứa

Ampicillin với nồng độ 50mg/l, ủ ở 37°C qua đêm. Hút 3ml LB lỏng lên mỗi đĩa, thu lấy các khuẩn lạc bằng que tam giác sau đó hút 3ml LB lỏng khác để thu nốt các tế bào còn lại trên đĩa. Thu tất cả dịch tế bào từ các đĩa vào một ống. Bổ sung glyxerol vào dịch tế bào tới nồng độ 20% và Amp tới nồng độ 50µg/ml. Trộn đều và chia dịch tế bào vào các ống eppendof, cất giữ ở -80°C,

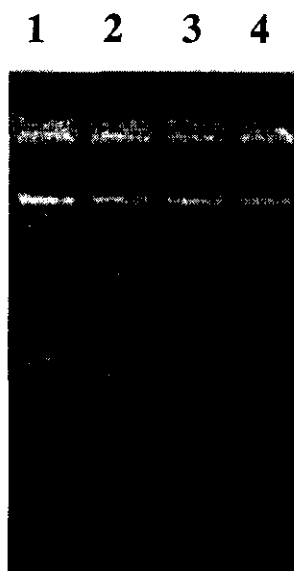
3.1.2.2. Kết quả và thảo luận

a) Tách ADN tổng số của chủng vi khuẩn *BtAB51*

Tách chiết và làm sạch ADN hệ gen có chất lượng tốt là một trong các kỹ thuật đầu tiên trong nghiên cứu sinh học phân tử. Các phân tử ADN có mức độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280nm. Mẫu ADN tương đối sạch protein có tỷ số OD_{260}/OD_{280} dao động trong phạm vi từ 1,8 - 2.

Chủng vi khuẩn *BtAB51* được nuôi trong môi trường LB lỏng và lắc 200v/phút ở 30°C trong 12 -15 giờ, các tế bào thu được dùng để tách chiết ADN tổng số. Kiểm tra độ tinh sạch và xác định hàm lượng ADN hệ gen trên máy đo quang phổ Model 8452A. Kết quả thu được: Chỉ số $OD_{260nm} = 0,058$; $OD_{280nm} = 0,031$; Tỷ số $OD_{260}/OD_{280} = 1,87$.

Hàm lượng ADN = $50 \times 0,058 \times 100 = 290$ (ng/µl).



Hình 15. ADN tách từ chủng *Bt AB51*

Giếng 1- 4: ADN của 4 lần tách song song

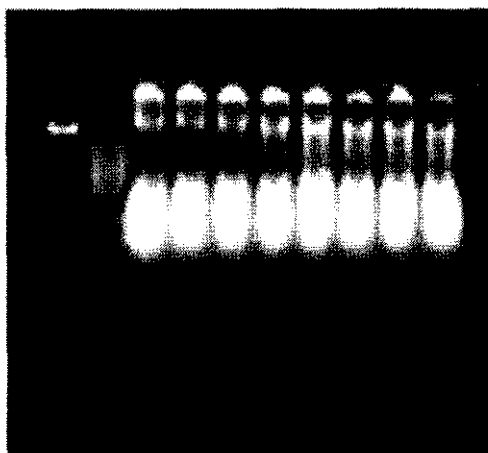
Kết hợp với phương pháp kiểm tra chất lượng ADN bằng điện di trên gel agarosa chúng tôi nhận thấy ADN thu được nhiều, có chất lượng tốt và đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

b) Kết quả cắt hạn chế ADN genome bằng *Sau3A*

Khi xây dựng một thư viện ADN genome, điều quan trọng là tạo ra các đoạn ADN có kích thước phù hợp với mục đích tách dòng. Tùy thuộc vào khả năng tách dòng của vector sử dụng (vector plasmit, phage, lai plasmit/phage) để chọn enzym cắt hạn chế, nồng độ

enzym, thời gian phản ứng thích hợp. Hơn nữa, trên thực tế thì một gen thường bị cắt thành nhiều đoạn ADN vì vị trí nhận biết của enzym thường nằm ngay trong gen. Việc khống chế nồng độ của enzym cũng như thời gian phản ứng cần lựa chọn sao cho các vị trí nhận biết không bị cắt đồng thời và các vết cắt được phân bố một cách ngẫu nhiên, cho phép thu được một gen nguyên vẹn ngay cả khi nó chứa vị trí nhận biết bên trong gen.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Hình 16. ADN tổng số được cắt bởi *Sau 3A*

Giếng 1. Thang ADN chuẩn 1kb; Giếng 2. ADN lamda (48,5kb); Giếng 3. Cắt 0 phút, Giếng 4-10: ADN tổng số cắt sau 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 phút tương ứng

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vector tách dòng là SuperCos1 là một loại vector lai plasmit/phage có khả năng tách dòng có kích thước 30-50kb. Để thu được các phân đoạn ADN thích hợp, chúng tôi đã khống chế thời gian phản ứng, cứ sau 2 phút lại làm bất hoạt enzym để tìm ra thời gian tối thích. Kết quả điện di ở hình 16 cho thấy có 2 giếng 9 và 10 (thời gian cắt là 12 phút và 14 phút) tạo ra các đoạn ADN có kích thước mong muốn 30 - 50kb.

c) Chuẩn bị vector tách dòng

SuperCos1 là vector nhân dòng và biểu hiện, có kích thước 7,9kb mang trình tự promoter bacteriophage SV40 và mang những đặc điểm quan trọng : i) mang 2 vị trí cos giữ vai trò quyết định trong phản ứng bao gói trong phage; ii) giữa hai vị trí này cos chứa một vị trí cắt duy nhất của *Bam*HI giúp chèn đoạn ADN cần nhân dòng; iii) mang gen kháng Ampicillin và Kanamycin giúp cho quá trình chọn lọc các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp; iv) có điểm khởi đầu sao chép của pUC, giúp cho quá trình tự nhân lên của vector trong tế bào vật chủ; v) điểm đa tách dòng MCS (multicloning site) có vị trí cắt duy nhất của một số enzym giới hạn để chèn các đoạn xen và kiểm tra mức độ đa dạng của thư viện gen; vi) hai điểm T3, T7 promoter ở hai đầu MCS, có vai trò là điểm bám của ARN polymeraza trong quá trình phiên mã.

Theo thiết kế vector SuperCos1 được mở vòng bằng enzym *Xba*I tại vị trí

1172. Kết quả điện di ở hình 17 cho thấy ở giếng 1 chỉ thu được 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 7,9kb, không có các vạch phụ. Điều này chứng tỏ toàn bộ ADN SuperCos1 đã bị cắt từ dạng vòng chuyển sang dạng thẳng. Vector đã mở vòng được xử lý tiếp bằng enzym CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) với mục đích khử các gốc phosphat ở đầu 5 để tránh sự đóng vòng trở lại.

Tiếp tục xử lý vector bằng *Bam*HI với mục đích tạo ra các đầu dính phù hợp với các đầu dính của ADN đoạn xen. Theo thiết kế của SuperCos1, *Bam*HI cắt vector ở vị trí 32 do vậy vector đã xử lý bị cắt thành 2 đoạn có kích thước 1,1kb và 6,8 kb. Kết quả điện di cho thấy ở giếng 3 (Hình17) sau khi xử lý vector bằng *Bam*HI chúng tôi chỉ nhận được 2 băng xấp xỉ 6,8kb và 1,1kb, điều này hoàn toàn phù hợp với phân tích trên lý thuyết. Hơn thế nữa, việc xử lý vector bằng enzym CIAP cho kết quả tốt do không thấy xuất hiện các vạch phụ của dạng vector đóng vòng ở giếng 3 trên bản điện di.



Hình 17. ADN vector qua xử lý

Giếng 1. ADN vectơ cắt bởi *Xba*I; Giếng 2. Thang ADN chuẩn 1 kb; Giếng 3. ADN vectơ cắt bởi *Xba*I và xử lý, bằng CIAP và cắt tiếp bởi *Bam*HI

Sử dụng enzym nối kết (ligaza) xúc tác cho hình thành liên kết nối hai đoạn ADN: ADN vector và ADN đoạn xen do có các đầu dính phù hợp, có thể bắt cặp bổ xung với nhau, trong môi trường có T_4 - ligaza thì ADN vector và các đoạn xen ADN *Bt* sẽ kết nối với nhau tạo ra các thể vector tái tổ hợp (dạng thẳng).

d) Phản ứng bao gói và xâm nhiễm

Trong tự nhiên, ADN của phage sau quá trình sao chép là phân tử ADN dài gọi là chuỗi khảm (concatemere) gồm nhiều bản sao của hệ gen lamda được nối liền nhau bởi các điểm cos. Sau đó chuỗi khảm được cắt tại các điểm cos bởi enzym endonucleaza do phage mã hoá, tiếp theo ADN được bọc gói thành các

capsid. Và chỉ có những đoạn ADN nào có kích thước khoảng 45 - 55kb thì mới có cơ chế được đóng gói vào phage. Những vector tái tổ hợp, hoặc là các đoạn ADN nào thu được có kích thước nhỏ hơn thì không có cơ chế đóng gói vào vỏ phage do vậy không được xâm nhiễm vào tế bào chủ qua cơ chế xâm nhiễm của phage.

Trong nghiên cứu chúng tôi đã sử dụng vector SuperCos1 vừa có khả năng bao gói tự nhiên của phage mà không làm tan tế bào chủ do trong quá trình thiết kế vector các gen gây tan tế bào chủ đã bị loại.

e) Phản ứng xâm nhiễm tạo thư viện ADN hệ gen

Sau khi các phage xâm nhiễm vào tế bào chủ, ADN của phage sẽ tự đóng vòng. Và chỉ có tế bào mang các đoạn ADN của vector tái tổ hợp và ADN vector chưa được khử gốc phosphat hoàn toàn mới có khả năng sống trên môi trường chọn lọc. Chúng tôi đã có thí nghiệm tạo thư viện gen sơ cấp đối chứng, nhưng trong phản ứng kết nối không bổ sung ADN *Bt* đoạn xen, tuy nhiên có một vài khuẩn lạc đã xuất hiện do vector tự kết dính (Hình 18A)



Hình 18. Thư viện gen sơ cấp
(A) đối chứng có 3 khuẩn lạc; (B) có đoạn ADN hệ gen *Bt* gắn vào vector

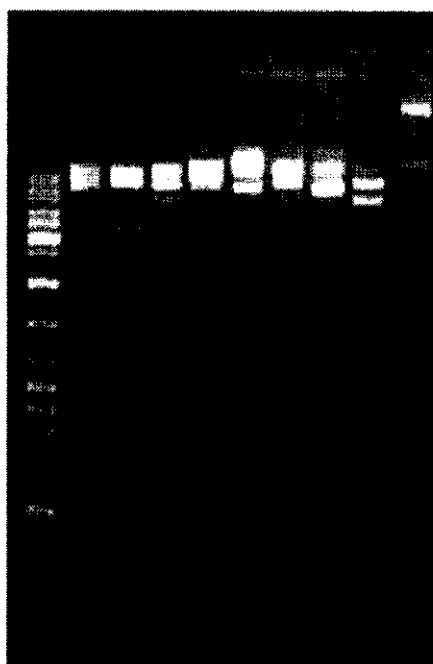
Với kích thước hệ gen *Bt* khoảng từ $2,4 \times 10^6$ đến $5,7 \times 10^6$ và kích thước các đoạn xen ADN cần nghiên cứu vào khoảng 30 - 40kb chúng tôi đã tính số các dòng cần thiết ở thư viện gen sơ cấp theo công thức $N = \ln(1-p) / \ln(1-a/b)$. Để đánh giá kết quả chính xác chúng tôi đã chọn $p = 0,99$. Kết quả nhận được số dòng cần thiết đại diện cho toàn bộ hệ gen của vi khuẩn *Bt* là từ 384 đến 875 dòng. Thí nghiệm thực tế thu được của thư viện gen sơ cấp là 7 đĩa khuẩn lạc (Hình 18B) tương ứng là khoảng 700 khuẩn lạc. Kết quả trên cho thấy thư viện thu được có số lượng khuẩn lạc đủ lớn đại diện cho toàn bộ hệ gen *Bt*. Với cách lập luận trên chúng tôi có thể kết luận rằng thư viện thu được đủ độ tin cậy cho các phân tích tiếp theo.

g) Đánh giá mức đa dạng của thư viện gen

Một thư viện gen tốt phải chứa các đoạn gen đại diện cho toàn bộ hệ gen của sinh vật nghiên cứu. Thể hiện bằng các dòng trong thư viện phải có mức độ đa dạng cao, các dòng đó phải mang các vector tái tổ hợp chứa các đoạn xen khác nhau không hoàn toàn (có các đoạn gối lên nhau). Đồng thời các đoạn xen khác nhau nên có số điểm nhận biết và vị trí nhận biết khác nhau đối với cùng một enzym giới hạn. Do đó khi xử lý các dòng khác nhau với cùng 1 enzym giới hạn, sản phẩm cắt có thể cho các băng khác nhau ở các dòng khác nhau.

Trong thí nghiệm này chúng tôi đã cắt hạn chế 8 dòng bằng *EcoRI*. Kết quả điện di trên Hình 19 thấy các dòng đều xuất hiện các băng khác nhau và một băng có kích thước khoảng 7,9kb. Điều này được giải thích vì theo thiết kế của vector SuperCos1 *EcoRI* sẽ cắt vector ở hai vị trí 1 và 65. Trong khi đó điểm gắn ADN đoạn xen ở vị trí 32. Theo tính toán như vậy, khi xử lý bằng enzym này đoạn vector ADN bị văng ra sẽ có kích thước khoảng 7,9kb và các đoạn xen ADN bị cắt bởi *EcoRI* khác nhau ở mỗi dòng. Từ các kết quả trên chúng tôi có thể tạm thời kết luận rằng các dòng trong thư viện gen có mức độ đa dạng khá cao và thư viện nhận được đủ tiêu chuẩn cho thí nghiệm tiếp theo.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Hình 19. Kết quả cắt ADN vector tái tổ hợp

Giếng 1: Marker 1kb; Giếng 2-9: ADN vector tái tổ hợp được cắt bằng *EcoRI*; Giếng 10: ADN vector tái tổ hợp đối chứng không cắt của mẫu giếng 4.

h) Kết luận

1. Từ chủng BtAB51 có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang đã tách được ADN hệ gen đạt độ sạch cao ($OD_{260}/OD_{280} = 1,87$) để phân đoạn bằng Sau3A và thiết kế thành công thư viện ADN hệ gen trên cơ sở ghép nối các phân đoạn trên vào vector SuperCos1.

2. Thư viện ADN hệ gen của chủng BtAB51 được đánh giá bằng cách cắt hạn chế với *EcoRI*. Kết quả cho thấy các phân đoạn ADN được gắn vào vector có kích thước khác nhau, chứng tỏ thư viện đảm bảo chất lượng tốt đủ tiêu chuẩn dùng cho việc sàng lọc tìm kiếm gen tiếp theo.

3.1.3. Phân lập gen *Pi-2(t)* kháng bệnh đạo ôn

3.1.3.1. Căn cứ khoa học và thực tiễn của việc tìm kiếm gen kháng đạo ôn

Hiện nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam, một số bệnh do virus, vi khuẩn, nấm đã gây nên những thiệt hại vô cùng to lớn và đang làm giảm đi chất lượng sản phẩm cũng như năng suất cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng. Đối với cây lúa thì một trong những bệnh có sức tàn phá mạnh nhất là bệnh đạo ôn. Bệnh này do nấm *Pyricularia orizae* gây ra. Theo ước tính của FAO, thiệt hại do bệnh này gây ra làm giảm năng suất lúa trung bình từ 0,7-17,5%. Những nơi bị bệnh nặng có thể bị giảm tới 80%.

Vì vậy, vấn đề cần đặt ra là tạo ra được nhiều giống lúa kháng bệnh. Việc này sẽ hạn chế được việc sử dụng các loại thuốc hóa học trừ sâu ảnh hưởng tới sức khỏe con người, gia súc và môi trường sinh thái đồng thời giảm được tối thiểu sự thất thoát mùa vụ. Tuy nhiên, kinh nghiệm trước đây cho thấy rằng những giống lúa kháng thường bị mất tính kháng sau một vài vụ trồng. Do vậy, cần phải tạo ra được những giống lúa có sức kháng bền hơn. Muốn vậy thì gen đa kháng phải được kết hợp từ nhiều cá thể khác nhau.

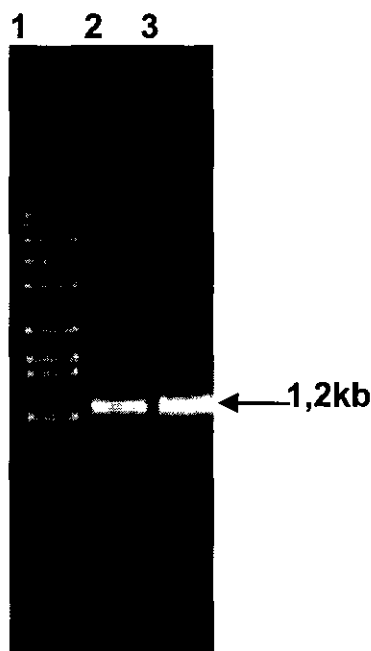
Ngày nay, với sự phát triển mạnh mẽ của Công nghệ Sinh học mà chủ công là các kỹ thuật chỉ thị phân tử cùng với các quan điểm lựa chọn chúng có thể cung cấp những giải pháp mới trong việc phát hiện, chọn lọc và duy trì nhiều kiểu gen kháng bền hơn ở lúa. Kết quả là một số lượng lớn gen kháng đạo ôn đã được lập bản đồ dựa trên các chỉ thị phân tử như: *Pi1(t)*, *Pi2(t)*, *Pi4(t)*, *Pi5(t)*, *Pi6(t)*, *Pi9(t)*, *Pi10(t)* và *Pi11(t)* (Causse và CS., 1994), *Pi5(t)* và *Pi7(t)* (Wang và CS, 1994) *Pia*, *Pib*, *Pik*, *Pit*, *Pita*, *Pi12(t)*, *Pi17(t)*, *Pi18(t)*, *Pi19(t)*, *Pi20(t)*, *Pi23(t)*, *Pi62(t)* và *Pi157(t)* (Nagato và Yoshomura, 1998), *Pitq1*, *Pitq5*, *Pitq6* và *Pilm2* (Tabien và CS, 2000), *Pi21(t)* (Fukuoka và CS, 2001).

Trong báo cáo này, chúng tôi thông báo kết quả tách dòng, đọc trình tự nucleotit của gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* ở giống lúa C101A51 và so sánh với trình tự của các tác giả đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế. *Pi-2(t)* là một trong những gen kháng đã được lập bản đồ, liên kết chặt với dấu phân tử RG64, nằm trên nhiễm sắc thể số 6, và cách đoạn RG64 một khoảng 2,8cM. Gen này cho tính kháng ở cả hai giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây lúa.

3.1.3.2. Kết quả phân lập gen *Pi-2(t)* và thảo luận

a) Nhân gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* bằng kỹ thuật PCR

Mẫu ADN tổng số của giống lúa C101A51 sau khi tách chiết được pha loãng và xác định mức độ hấp thụ tử ngoại (OD) trên máy đo quang phổ đã đảm bảo đủ độ tinh khiết và nồng độ cần thiết được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR với cặp mồi RG64F/RG64R. Cặp mồi này được thiết kế dựa trên hai đầu của đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế. Theo lý thuyết, sử dụng cặp mồi này sẽ nhân được đoạn gen có kích thước 1,2kb. Sản phẩm PCR hoàn thành được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%.



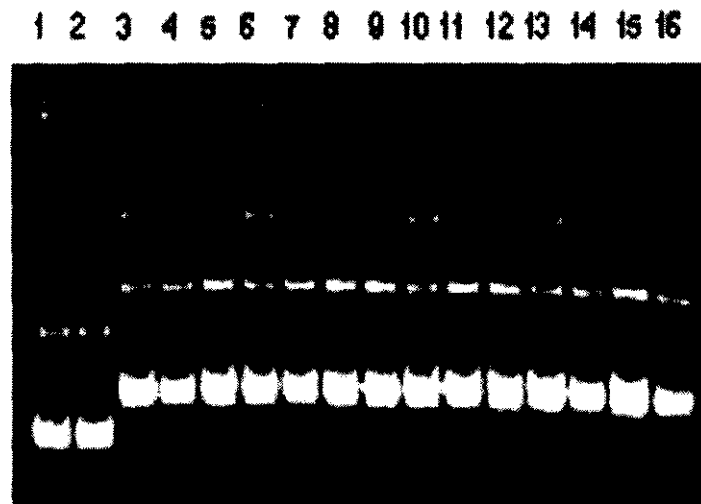
Hình 20. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi RG64

1: Marker; 2,3: Sản phẩm PCR giống lúa C101A51

Kết quả điện di với giống lúa C101A51, chúng tôi thu được sản phẩm PCR rất đặc hiệu, kích thước phân tử của đoạn được nhân lên khoảng 1,2kb. Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết cũng như phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả nước ngoài khi họ sử dụng cặp mồi này để nghiên cứu giống lúa C101A51. Điều này chứng tỏ genom của giống C101A51 đã nghiên cứu có mang

gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*.

b) Tách dòng gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*



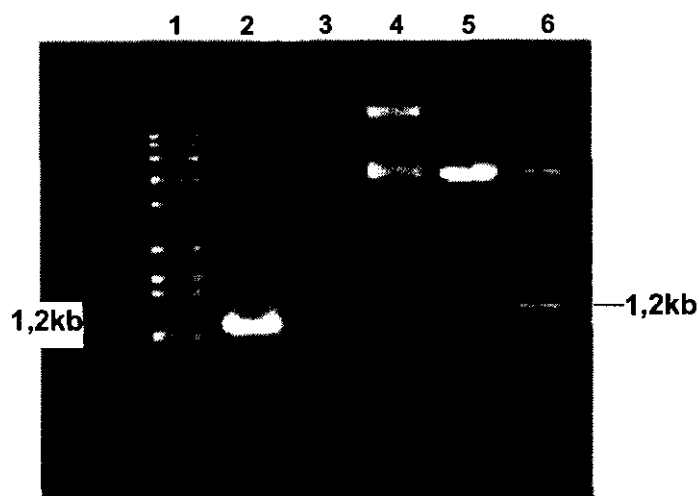
Hình 21. Kết quả điện di các plasmit tái tổ hợp mang gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*

1 - 2: Plasmit tách từ khuẩn lạc xanh; 3-16: Plasmit tách từ khuẩn lạc trắng

Sau khi gắn sản phẩm PCR vào vectơ pCR⁺2.1, chúng tôi tiến hành biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α . Cấy trải trên môi trường thạch LB có bổ sung ampicillin, IPTG, X-gal. Trong môi trường chọn lọc này, theo lý thuyết thì các khuẩn lạc *E.coli* mang vectơ tái tổ hợp sẽ có màu trắng trong khi đó các khuẩn lạc mang vectơ pCR⁺2.1 gốc (không dính thêm ADN ngoại lai) sẽ có màu xanh. Để kiểm tra kết quả lai sản phẩm PCR vào vectơ pCR2.1 và biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α , chúng tôi nhặt ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và xanh để tách chiết. Kết quả tách chiết ADN plasmit được tiến hành điện di trên gel agarosa 1%. Kết quả được trình bày ở Hình 21.

Trên ảnh điện di ta thấy các plasmit ở các kênh 3 -16 có khả năng là các plasmit tái tổ hợp vì chúng có kích thước lớn hơn vectơ pCR2.1 gốc và chúng tôi chọn các mẫu mang các plasmit có kích thước lớn này để tiếp tục nghiên cứu. Mặc dù vậy trong quá trình gắn sản phẩm PCR vào vectơ, có thể có một số sản phẩm phụ cũng được gắn vào vectơ. Tức là, có những đoạn có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* chúng tôi thấy cần nhận lên. Do đó, cần phải kiểm tra sản phẩm plasmit đã chọn bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn. Dựa vào bản đồ vectơ pCR2.1 có một điểm cắt của *EcoRI* nằm trong vùng cắt gắn đa vị trí. Do đó, chúng tôi sử dụng enzyme *EcoRI* để cắt plasmit tái tổ hợp thành vectơ và đoạn ADN ngoại lai riêng rẽ. Chúng tôi đã tiến hành cắt mẫu mang khuẩn lạc có màu trắng (mang đoạn ADN ngoại lai) và mẫu mang khuẩn lạc có

màu xanh với enzym *EcoRI*. Sau khi cắt, sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Kết quả điện di được trình bày ở Hình 22.



Hình 22. Điện di kiểm tra ADN plasmit tái tổ hợp cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI*

1: Marker; 2: Sản phẩm PCR trước khi gắn vào vectơ; 3: Plasmit tách từ khuẩn lạc xanh; 4: Plasmit tách từ khuẩn lạc trắng; 5: Plasmit tách từ khuẩn lạc xanh cắt bằng *EcoRI*; 6: Plasmit tách từ khuẩn lạc trắng cắt bằng *EcoRI*

Qua ảnh điện di ta thấy, ở kênh số 5 sau khi cắt bằng enzym *EcoRI* cho ra một băng có trọng lượng phân tử đúng bằng trọng lượng phân tử của vectơ pCR2.1 còn kênh số 6 cho ra hai băng: một băng có kích thước tương ứng với kích thước của vectơ pCR2.1; một băng có kích thước 1,2kb đúng bằng với kích thước của băng sản phẩm PCR. Kết quả này cho phép ta khẳng định sản phẩm PCR đã được gắn vào vectơ pCR2.1.

c) Xác định trình tự axit nucleic, đoạn ADN sản phẩm PCR

Những plasmit mang gen *Pi-2(t)* của giống lúa C101A51 đã được tách với số lượng lớn để xác định trình tự nucleotit và so sánh với trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế bằng chương trình phần mềm CLUSTAL W1.81.

Kết quả phân tích cho thấy trình tự nucleotit của sản phẩm mà chúng tôi thu được sau phản ứng PCR so với trình tự mà các tác giả đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế có độ tương đồng cao (99,35%). Kết quả nhận được sẽ góp phần vào việc thiết kế vector mang gen *Pi-2(t)* phục vụ chuyển gen và phát triển lúa kháng đạo ôn trong tương lai.

3.1.3.3. Kết luận về phân lập gen *Pi-2(t)*

1. Bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi RG64F/RG64R, chúng tôi đã nhân được gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* có kích thước 1,2kb từ ADN hệ gen của giống

lúa C101A51.

2. Đã tách dòng phân tử gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* từ giống lúa C101A51 trong vectơ tách dòng pCR2.1.
3. Đã xác định trình tự nucleotit của gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* và so sánh với trình tự mà các tác giả đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế. Kết quả có độ tương đồng cao 99,35%.

3.1.4. Kết quả phân lập gen *Pi-1(t)* kháng đạo ôn

Tương tự như phương pháp phân lập gen *Pi-2t* trên và dựa vào dấu phân tử RZ536 liên kết chặt với gen kháng đạo ôn *Pi-1*. Chúng tôi đã sử dụng cặp mồi RZ536F/RZ536R để nhân đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-1* có kích thước 234bp. Sau đó, đoạn gen này được tách dòng bằng vectơ tách dòng pCR2.1. TOPO và sau đó được phân tích trên máy xác định trình tự ADN tự động (3100 - Avant Genetic Analyser) với bộ kit của hãng Applied. Kết quả đọc trình tự gen *Pi-1* và so sánh với các trình tự đã công bố cho thấy có độ tương đồng cao (99,15%) được thể hiện ở Hình 23.

C101Lac Tetep	ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGNNNAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGN ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGAAAAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGA *****
C101Lac Tetep	NNCGACCCTGTTGCCAAGAAGCTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT CCCGACCCTGTTGCCAAGAAGCTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT *****
C101Lac Tetep	TANNNCTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAATTATTTCTCCTTTTTATGTTT TAAACTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAATTATTTCTCCTTTTTATGTTT ** *****
C101Lac Tetep	TCTCTTTGTTCTGTGTATCAGATCGCGCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT TCTCTTTGTTCTGTGTAGNNGATCGCCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT *****

Hình 23. Trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-1* từ giống lúa Tẻ tép so với trình tự nucleotit trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế (C101Lac)

3.2. HOÀN THIỆN CÁC QUI TRÌNH CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU VÀ GEN CHỊU HẠN VÀO CÂY BÔNG VẢI

3.2. Hoàn thiện các quy trình chuyển gen kháng sâu và gen chịu hạn vào cây bông vải

- 3.2.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây bông vải
- 3.2.2. Hoàn thiện hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây bông *in vitro* phục vụ chuyển gen
 - 3.2.2.1. Tái sinh cây bông bằng phương pháp đa chồi
 - 3.2.2.2. Tái sinh cây bông qua phôi soma
- 3.2.3. Xây dựng qui trình chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm
 - 3.2.3.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu
 - 3.2.3.2. Kết quả chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm
- 3.2.4. Kết luận và đề nghị

3.2.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây bông vải

Cây bông vải (*Gossypium hirsutum* L.) là nguồn cung cấp sợi may mặc quan trọng. Song năm 2000, Việt Nam mới chỉ sản xuất được 8 ngàn tấn, đáp ứng được 10% nhu cầu. Theo chương trình phát triển ngành dệt may, Việt Nam đến năm 2005 phải sản xuất 150.000 tấn sợi các loại và đến năm 2010 chỉ tiêu đó là 300.000 tấn. Nguyên nhân làm sản lượng thấp chủ yếu là bông bị sâu bệnh và hạn hán. Vì thế một trong những chiến lược để tăng sản lượng bông là tạo ra những giống bông có khả năng kháng sâu và chịu hạn. Chuyển gen là một phương pháp để tạo ra những giống bông như vậy.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học thực vật, đặc biệt là công nghệ chuyển gen vào thực vật, các phương pháp chuyển gen đang được sử dụng nhiều ở thực vật nói chung và cây bông nói riêng là súng bắn gen, *Agrobacterium* và chuyển gen trực tiếp qua ống phấn bằng vi tiêm...

Tuy nhiên, để chuyển được gen thì trước tiên cần phải thiết lập và tối ưu cho được hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây *in vitro*. Khả năng nuôi cấy và tái sinh cây tùy thuộc vào các kiểu gen của từng loại đối tượng cây trồng. Với phương pháp chuyển gen trực tiếp qua ống phấn đòi hỏi phải hoàn thiện được quy trình vi tiêm, thu hạt và đặc biệt là sàng lọc các dòng cây mang gen.

Như vậy, với mục tiêu tái sinh được cây và chuyển gen có định hướng như kháng sâu bệnh và chịu hạn trực tiếp vào những giống có năng suất cao, chất lượng sợi tốt và đang trồng phổ biến. Chúng tôi tiến hành các thí nghiệm nhằm tái sinh cây bông qua phôi soma, đa chồi, đồng thời xây dựng quy trình biến nạp gen bằng vi tiêm và chọn lọc các dòng bông mang gen chuyển.

3.2.2. Hoàn thiện hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây bông *in vitro* phục vụ chuyển gen

Cây bông vải là một đối tượng rất khó thành công trong nuôi cấy *in vitro*. Trên thế giới có hàng trăm phòng thí nghiệm đã tiến hành nghiên cứu thử nghiệm việc nuôi cấy mô tế bào cây bông, nhưng kết quả chỉ hạn chế trên hai giống là Sisamrong (Thái Lan) và Cooker (Hoa Kỳ) [Trương Thu Thủy et al. 2003]. Vì vậy, đề tài tập trung nghiên cứu hoàn thiện hai kỹ thuật tái sinh là thông qua đa chồi và thông qua phôi soma nhằm tìm ra cách thức thích hợp cho những nguyên liệu làm giống khác nhau.

3.2.2.1. Tái sinh cây bông bằng phương pháp tạo đa chồi

a) Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

- Vật liệu

Giống bông 254 được Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây có sợi cung cấp.

- Phương pháp nghiên cứu

* Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu tái sinh cây

Các hạt bông sau khi đã bóc vỏ cứng được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% (Hóa chất Việt Trì) trong 20-25 phút và rửa nhiều lần đến khi nước trong. Cuối cùng hạt được thấm khô bằng giấy lọc vô trùng và tách bỏ lá mầm, thu lấy thân phôi có cả đỉnh rễ và đỉnh chồi.

* Cảm ứng mô sẹo, cảm ứng đa chồi và tái sinh cây

Phôi sau đó được đặt lên các môi trường cảm ứng mô sẹo C1-C20. Sau 10 ngày, đỉnh chồi của phôi được cắt với độ dài trung bình 2mm và cấy lên các môi trường tạo đa chồi S1-S5 một cách ngẫu nhiên như bảng 2. Sau 5 tuần, những đỉnh chồi tạo 1 chồi gọi là có phản ứng, tạo nhiều hơn 1 chồi được gọi là tạo đa chồi, hay là tạo cụm chồi (shoot mass). Chúng được cấy chuyển lên chính môi trường tạo đa chồi ban đầu và theo dõi sau 3 tuần tiếp theo. Sau đó, các chồi đơn được tách ra từ các cụm chồi và cấy chuyển lên các môi trường kéo dài chồi (E0-E2). Chồi cao khoảng 2 - 4cm, thì được kích thích tạo rễ trên các môi trường R1-R2. Cây con cao hơn 3cm được trồng trên đất để thu được cây tái sinh.

* Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các tổ hợp môi trường nuôi cấy đã nói ở trên được trình bày trong bảng sau đây:

Bảng 5. Thành phần các môi trường tái sinh cây và tạo đa chồi

Thành phần cơ bản chung của các môi trường		Các muối MS ^a cơ bản: 30g/L sacharosa, 9g/L aga, 1g/L than hoạt tính cho môi trường E và R			
Thành phần chất điều khiển sinh trưởng trong các môi trường		2,4-D ^b (mg/L)	Kin ^c (mg/L)	BAP ^d (mg/L)	NAA ^e (mg/L)
Môi trường cảm ứng mô sẹo	C0	-	-	-	-
	C1	0,05	-	0,40	0,10
	C2	0,10	-	0,40	0,10
	C3	0,20	-	0,40	0,10
	C4	0,40	-	0,40	0,10
	C5	0,05	-	0,80	0,10
	C6	0,10	-	0,80	0,10
	C7	0,20	-	0,80	0,10
	C8	0,40	-	0,80	0,10
	C9	0,05	-	1,00	0,10
	C10	0,10	-	1,00	0,10
	C11	0,20	-	1,00	0,10
	C12	0,40	-	1,00	0,10
	C13	0,05	-	1,50	0,10
	C14	0,10	-	1,50	0,10
	C15	0,20	-	1,50	0,10
	C16	0,40	-	1,50	0,10
	C17	0,05	-	2,00	0,10
	C18	0,10	-	2,00	0,10
	C19	0,20	-	2,00	0,10
	C20	0,40	-	2,00	0,10
Môi trường tạo đa chồi	S1	-	0,50	0,50	0,10
	S2	-	1,00	1,00	0,10
	S3	-	2,00	2,00	0,10
	S4	-	2,50	2,50	0,10
	S5	-	1,00	2,00	0,10
Môi trường kéo dài chồi	E0	-	-	-	-
	E1	-	0,10	0,10	-
	E2	-	0,50	0,50	-
Môi trường tạo rễ	R1	-	-	-	0,20
	R2	-	-	-	0,50

^a: Murashige và Skoog

^b: 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid; ^c: Kinetin; ^d: 6-Benzyl amino purin; ^e: 1-Naphthyl acetic acid.

Môi nuôi cấy được đặt trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và chế độ chiếu sáng 8h/16h với cường độ ánh sáng 2000lux.

b) Kết quả và thảo luận

- Mô sẹo hóa phôi và phá vỡ ưu thế đôn chồi

Trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng C0, phôi nhanh chóng vươn dài thành cây con và phát triển lá. Trong khi đó, trên tất cả các môi trường cảm ứng mô sẹo còn lại (C1-C20), 100% phôi không phát triển thành cây hoàn chỉnh mà phình to, phát sinh mô sẹo màu trắng. Như vậy, sự kết hợp 2,4-D, BAP và NAA đã có tác dụng làm kim hãm quá trình biệt hóa, tạo ra nhiều tế bào liên tục phân chia. Mức độ kim hãm và mô sẹo hóa mạnh hơn trên các môi trường có hàm lượng 2,4-D cao hơn (những môi trường có 0,2 và 0,4mg/L). Sau 10 ngày, chiều cao trung bình của phôi là 1,5 cm, dao động từ 1 - 4cm. Lúc này, đỉnh chồi

được cắt làm nguyên liệu tạo đa chồi. Môi trường C16 có mức độ mô sẹo hóa vừa phải và đồng đều nhất, được coi là môi trường mô sẹo hóa tối ưu.

- Sự hình thành cụm chồi

Với mong muốn thu được cụm chồi, các đỉnh chồi của phôi kích thước 2mm đã được đặt lên các môi trường kích thích tạo đa chồi (S1 - S5) là các tổ hợp khác nhau của Kinetin, BAP và NAA. Sau 5 tuần, chồi mới chỉ xuất hiện ở dạng đơn chồi, hoặc dạng cụm chỉ có 2 - 3 chồi (Bảng 6). Cụm chồi vào thời điểm này có tỉ lệ rất thấp (32%) và phát triển rất chậm so với đơn chồi.

Tỉ lệ phôi bị chết hoặc bị ức chế tương đối cao như trong Bảng 6 có thể do phôi được cấy trên môi trường khá dày đặc, các hợp chất phenol do mẫu vật tiết ra đã ức chế phôi. Cũng có thể hàm lượng các chất điều khiển sinh trưởng như vậy là tương đối lớn, phần nào phá vỡ thế cân bằng giữa sự mô sẹo hóa và biệt hóa thành chồi sau này.

Bảng 6. Sự hình thành chồi sau 5 tuần

Môi trường mô sẹo hóa	Môi trường tạo đa chồi	Tổng số đỉnh chồi	Chết hoặc không chồi	Đơn chồi	Cụm 2 chồi	Cụm 3 chồi	Chiều dài chồi (cm)
C4	S1	14	2	8	0	4	1-1,2
C7		16	4	8	4	0	0,1-0,5
C3		16	4	6	4	2	0,1-0,5
C10	S2	16	2	6	4	4	0,1-0,5
C5		16	4	4	6	2	0,1-0,5
C16		16	6	2	6	2	0,1-0,5
C17		16	4	2	8	2	0,1-0,5
C13		14	0	14	0	0	0,1-0,5
C18	S3	16	6	6	4	0	0,1-0,5
C9		16	10	4	2	0	0,1-0,5
C14		16	12	0	4	0	0,1-0,5
C11	S4	16	10	4	2	0	0,1-0,5
C15		14	2	10	2	0	0,1-0,5
C19		14	4	6	4	0	0,1-0,5
C20	S5	16	0	4	8	4	0,1-0,5
C8		16	10	2	2	2	0,1-0,5
C12		16	4	6	6	0	0,1-0,5
Tổng		264	84	92	66	22	
Tỉ lệ tạo cụm 2 chồi và cụm 3 chồi tương ứng:					25%	8%	
Tỉ lệ tạo cụm chồi sau 5 tuần (gồm cả 2 và 3 chồi):					32%		
Tỉ lệ tạo chồi (kể cả đơn và đa chồi) sau 5 tuần:				68%			

Bảng 7. Sự hình thành cụm chồi trên các môi trường S2-S5

Môi trường	Số đỉnh chồi cấy chuyển	Số cụm chồi > 2 chồi	Tỉ lệ tạo cụm chồi trên tổng số cấy chuyển	Số chồi trung bình
S2	36	- 30	83%	4
S3	45	36	80%	4
S4	40	32	80%	5
S5	42	39	93%	4
S2+S3+S4+S5	163	137	84%	4
<i>Tỉ lệ tạo cụm chồi so với tổng số phôi:</i>			57%	

Sau giai đoạn 5 tuần, các đỉnh chồi đã hình thành đơn chồi hoặc cụm chồi, hoặc không có chồi nhưng vẫn chưa phải là mô chết đều được cấy chuyển lên chính môi trường đa chồi ban đầu là S2-S4, với hy vọng tiếp tục thu được cụm chồi. Ba tuần sau khi được nuôi cấy một lần nữa trên các môi trường tạo đa chồi, các cụm chồi trung bình 4 chồi/cụm và nhiều nhất là 10 chồi/cụm đã hình thành (Bảng 6). Như vậy, sau 5 tuần trên môi trường tạo đa chồi thì mới chỉ thu được 0-3 chồi từ mỗi mẫu vật, còn sau 8 tuần với một lần thay mới môi trường đã thu được các cụm chồi có hệ số chồi cao hơn (Bảng 6). Có những mẫu vật không có chồi nào trước khi được cấy chuyển nhưng lại tạo cụm chồi sau khi cấy chuyển. Hầu hết các môi trường S cho tỉ lệ tạo đa chồi so với tổng số mẫu vật cấy chuyển cao, từ 80% - 93%. Do đó, trung bình tỉ lệ tạo cụm chồi có nhiều hơn 3 chồi là khá cao, so với tổng số đỉnh chồi trải qua cấy chuyển là 84% và so với tổng số phôi đưa vào là 57% (84% x 68%, kết hợp Bảng 7 và 8). Từ Bảng 7, tỉ lệ tạo cụm chồi đạt cao nhất trên môi trường S5 có 1mg/L 2,4-D, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA. Vậy môi trường S5 được chọn là môi trường tối ưu cho quy trình tạo đa chồi áp dụng cho biến nạp gen sau này.

Một đặc điểm nữa đáng chú ý là chồi hình thành rất ngắn (0,1 - 0,8cm), ít phát triển trên môi trường tạo đa chồi. Điều này là hợp lý vì môi trường tạo đa chồi có các hoóc môn sinh trưởng Kinetin và BAP có tác dụng chính làm cho các tế bào phân chia theo dạng tạo đa chồi.

- Sự kéo dài của chồi

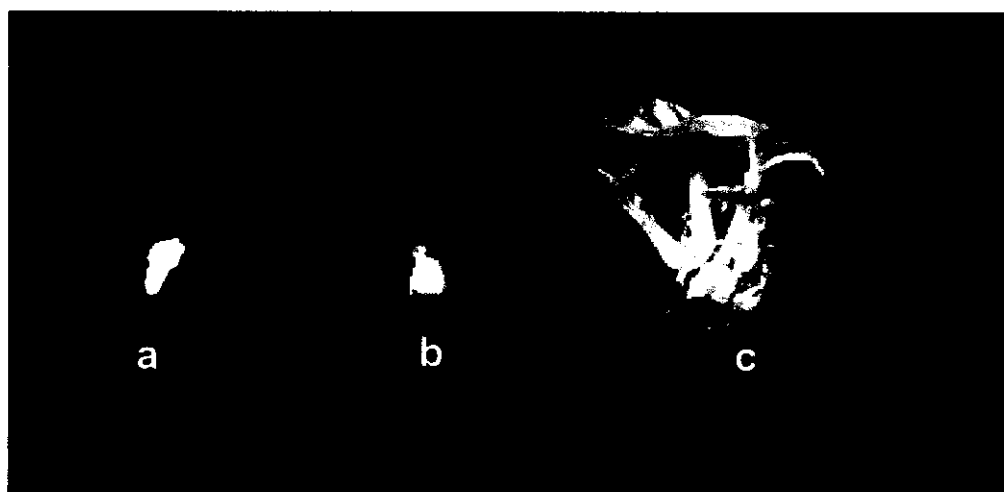
Kết quả kéo dài chồi được thể hiện trong Bảng 8. Các chồi kích thước từ 1cm trở lên được coi là có cảm ứng kéo dài. Một số chồi hình thành rễ ngay trên những môi trường này.

Như vậy là các môi trường không có hoóc môn hoặc có nồng độ hoóc môn Kinetin, BAP thấp (Bảng 8) đã có tác dụng kéo dài chồi. Các nghiên cứu của Perlak

và CS chỉ ra rằng sự vắng mặt của hoóc môn sinh trưởng hỗ trợ sự phát triển của chồi tốt nhất, điều này cũng được thể hiện trong nghiên cứu của chúng tôi. Môi trường E0 cho tỉ lệ kéo dài chồi cao nhất là 30%, chứng tỏ rằng hàm lượng auxin và cytokinin nội sinh tạo ra trong quá trình hình thành và phát triển của chồi là rất lớn. Sự kết hợp của lượng hoóc môn nội sinh với lượng hoóc môn được bổ sung vào các môi trường E1 và E2 có thể đã ức chế chồi phát triển. Do vậy, môi trường E0 là môi trường tối ưu đối với sự phát triển chiều cao của chồi.

Bảng 8. Tỉ lệ kéo dài chồi và chiều cao chồi trên các môi trường E0-E2

Môi trường	Số chồi được kích thích kéo dài	1 cm	2 cm	≥ 3 cm	Tỉ lệ chồi kéo dài
E0	33	3	4	3	30%
E1	39	2	4	2	21%
E2	44	2	3	1	13%



Hình 24. Quá trình tạo đa chồi từ phôi: a: Phôi; b: Đỉnh chồi; c: Cụm chồi sau khi cấy chuyển

- Sự hình thành rễ

Theo Perlak và CS, môi trường 1/2 MS với một lượng nhỏ NAA hoặc không có NAA, đôi khi có thêm than hoạt tính đều cho ra tỉ lệ tạo rễ cao (Perlak và CS, 1990). Kết quả tạo rễ ở bảng 9 cũng rất tương tự, trên môi trường MS (không phải 1/2MS) với NAA, sự hình thành rễ diễn ra khá dễ dàng đối với chồi bông vì tỉ lệ cao. Đồng thời để ý rằng, trên môi trường kéo dài chồi không có chất điều khiển sinh trưởng E0, như đã nói ở trên, một số chồi đã hình thành rễ. Môi trường R1 với hàm lượng 0,2mg/L NAA và 1g/L than hoạt tính cho sự tạo rễ tốt nhất là 100%.

Bảng 9. Tỷ lệ tạo rễ trên môi trường R1 và R2

Môi trường	Số chồi được kích thích tạo rễ	Số chồi tạo rễ	Tỷ lệ tạo rễ
R1	27	27	100%
R2	30	21	70%

Ngoài ra, có nghiên cứu đã chứng minh rằng chồi sau khi được kéo dài cũng có thể được trồng luôn ra đất, bỏ qua môi trường tạo rễ.

- Quy trình tái sinh cây bông bằng tạo đa chồi

Kết hợp các kết quả trên đây, một quy trình tái sinh cây bông được thiết lập như sau: Phôi được tách từ hạt và đặt trên môi trường MS có 0,4mg/L 2,4-D, 1,5mg/L BAP và 0,1mg/L NAA trong 10 ngày. Sau đó, cắt và nuôi cấy đỉnh chồi kích thước 2 mm trên môi trường tạo đa chồi có 1mg/L Kinetin, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA trong thời gian 8 tuần với một lần cấy chuyển, thu được các cụm chồi. Tiếp theo, môi trường không có hoặc môn sinh trưởng được dùng để chồi phát triển chiều cao. Cuối cùng, chồi được tạo rễ trên môi trường có 0,2 mg/L NAA. Cây con được chuyển ra đất để thu được cây tái sinh hoàn chỉnh.

Tiếp tục áp dụng quy trình trên, chúng tôi thu được các kết quả tương tự với các giống LRA, VN36P, C118, D16-2, TM1, SSR, Cooker, SB1. Các kết quả cho thấy không có sự sai khác rõ rệt giữa các giống. Đây là cơ sở thuận lợi cho các thí nghiệm tiếp theo.

c) Kết luận về qui trình tái sinh cây bông qua cụm chồi

Đã nghiên cứu hoàn thiện được quy trình tái sinh *in vitro* ở cây bông bằng phương pháp tạo cụm đa chồi từ phôi 9 giống bông vải. Phôi bông được nuôi cấy trên môi trường MS có tổ hợp 0,4mg/L 2,4-D, 1,5mg/L BAP và 0,1mg/L NAA, sau đó đỉnh chồi được cấy chuyển lên môi trường có 1mg/L Kinetin, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA để tạo cụm chồi. Chồi phát triển kéo dài trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng. Sau cùng, một lượng rất nhỏ NAA được dùng để kích thích tạo rễ. Kết quả này khẳng định một triển vọng cho việc khắc phục những khó khăn của việc tái sinh theo con đường tạo phôi soma ở loại cây khó nuôi cấy này.

Tỷ lệ tạo cụm chồi và số lượng chồi khá cao chứng tỏ tính khả thi của công tác chuyển nạp gen vào cây bông. Quy trình đang áp dụng để biến nạp gen thông qua *Agrobacterium*.

3.2.2.2. Tái sinh cây bông qua phôi soma

a) Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

- Nguyên liệu

Hạt của các giống bông, SB1, TM1, SSR 60F, 254, LRA 5166, VN36P, C118A do Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây Có Sợi cung cấp.

- Phương pháp nghiên cứu

* Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Trong thí nghiệm này, tất cả các môi trường đều xuất phát từ môi trường cơ bản (MS0), chỉ khác nhau ở thành phần và hàm lượng các chất điều khiển sinh trưởng. Môi trường cơ bản đó gồm các muối MS đa lượng, vi lượng theo Murashige và Skoog, 9g/L thạch, vitamin B5 theo Gamborg, 0,75g/L $MgCl_2$, 30 g/L glucoza. Tất cả các bình nuôi cấy đều được đặt trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$ và chế độ chiếu sáng 8h/24h với cường độ ánh sáng 2000 lux.

* Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu tạo mô sẹo

Hạt bông sau khi tách sợi được lột bỏ lớp lông ngắn bằng H_2SO_4 đậm đặc, xả nước cho thật sạch, thấm khô bằng giấy thấm khử trùng, hạt được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% (Hóa chất Việt Trì) trong 20-25 phút và rửa nhiều lần bằng nước cất khử trùng đến khi nước trong. Cuối cùng hạt được thấm khô bằng giấy thấm vô trùng. Cấy lên môi trường đặt hạt là môi trường cơ bản MS0 như nêu ở trên. Khi cây non được 10-15 ngày tuổi thì bắt đầu tiến hành lấy nguyên liệu tạo mô sẹo.

* Cảm ứng tạo mô sẹo

Nguyên liệu tạo mô sẹo gồm các đoạn thân mầm dài 1cm và mảnh lá mầm diện tích khoảng $16mm^2$. Chúng tôi xem xét khả năng cảm ứng tạo mô sẹo của các môi trường nuôi cấy có bổ sung tổ hợp các chất điều khiển sinh trưởng ở những nồng độ khác nhau (Bảng 10), thuộc 1 trong 3 loại tổ hợp sau: kết hợp 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và Kinetin; kết hợp Kinetin và 1-Naphthyl acetic acid (NAA); và kết hợp Zeatin và NAA. Đánh giá khả năng cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 10. Thành phần các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo

Các loại môi trường và tên môi trường		Thành phần chất điều khiển sinh trưởng			
		2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Zeatin (mg/L)	NAA (mg/L)
Tổ hợp loại 1	MS1	0,10	0,10	-	-
	MS2	0,20	0,10	-	-
	MS3	0,40	0,10	-	-
	MS4	0,10	0,20	-	-
	MS5	0,20	0,20	-	-
	MS6	0,40	0,20	-	-
	MS7	0,10	0,40	-	-
	MS8	0,20	0,40	-	-
	MS9	0,40	0,40	-	-
Tổ hợp loại 2	MSR1	-	0,50	-	0,50
	MSR2	-	0,50	-	1,00
	MSR3	-	0,50	-	1,50
	MSR4	-	0,50	-	2,00
	MSR5	-	0,50	-	2,50
	MSR6	-	0,50	-	3,00
Tổ hợp loại 3	MSC1	-	-	0,10	0,01
	MSC2	-	-	0,50	0,01
	MSC3	-	-	1,00	0,01
	MSC4	-	-	2,00	0,01
	MSC5	-	-	0,10	0,05
	MSC6	-	-	0,50	0,05
	MSC7	-	-	1,00	0,05
	MSC8	-	-	2,00	0,05
	MSC9	-	-	0,10	0,10
	MSC10	-	-	0,50	0,10
	MSC11	-	-	1,00	0,10
	MSC12	-	-	2,00	0,10

Dấu "-": không có

*** Nhân và duy trì mô sẹo**

Sau 4 tuần, chuyển tất cả các mẫu vật đã mô sẹo hóa lên môi trường nhân và duy trì mô sẹo vẫn giữ nguyên nồng độ các chất điều khiển sinh trưởng tương ứng (MS1-MS9; MSR1-MSR9; MSC1-MSC9), hoặc có nồng độ các chất điều khiển sinh trưởng tương ứng ở nồng độ rất thấp (NMSa,b, NMSRa,b; NMSCa,b hoặc loại bỏ hoàn toàn chất điều khiển sinh trưởng (MS0). Cách bố trí này (Bảng 11) sẽ cho phép đánh giá ảnh hưởng của lượng hoóc môn sinh trưởng lên sự duy trì mô sẹo và phân hóa phôi. Sau 4 tuần, cấy chuyển toàn bộ mô sẹo lên môi trường MS0, và tiếp tục cấy chuyển sau mỗi 4 tuần. Ví dụ: mô sẹo hình thành trên môi trường MS1 được cấy chuyển lên 4 loại môi trường là MS1, NMSa, NMSb và MS0. Bốn

tuần sau, cấy chuyển toàn bộ những mô sẹo đó lên MS0 và tiếp tục thay môi trường MS0 sau mỗi 4 tuần. Điều đáng chú ý là khối mô sẹo được giữ nguyên và cấy chuyển chứ không cắt nhỏ như đối với một số đối tượng khác.

Bảng 11. Thành phần các môi trường nhân và duy trì mô sẹo

Môi trường cảm ứng mô sẹo	Môi trường nhân mô sẹo tương ứng	Thành phần chất điều khiển sinh trưởng			
		2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Zeatin (mg/L)	NAA (mg/L)
Tổ hợp loại 1	MS1	0,10	0,10	-	-
	MS2	0,20	0,10	-	-
	MS3	0,40	0,10	-	-
	MS4	0,10	0,20	-	-
	MS5	0,20	0,20	-	-
	MS6	0,40	0,20	-	-
	MS7	0,10	0,40	-	-
	MS8	0,20	0,40	-	-
	MS9	0,40	0,40	-	-
	NMSa	0,10	0,10	-	-
	NMSb	0,05	0,05	-	-
	MS0	-	-	-	-
Tổ hợp loại 2	MSR1	-	0,50	-	0,50
	MSR2	-	0,50	-	1,00
	MSR3	-	0,50	-	1,50
	MSR4	-	0,50	-	2,00
	MSR5	-	0,50	-	2,50
	MSR6	-	0,50	-	3,00
	NMSRa	-	0,25	-	0,25
	NMSRb	-	-	-	0,5
	MS0	-	-	-	-
Tổ hợp loại 3	MSC1	-	-	0,10	0,01
	MSC2	-	-	0,50	0,01
	MSC3	-	-	1,00	0,01
	MSC4	-	-	2,00	0,01
	MSC5	-	-	0,10	0,05
	MSC6	-	-	0,50	0,05
	MSC7	-	-	1,00	0,05
	MSC8	-	-	2,00	0,05
	MSC9	-	-	0,10	0,10
	MSC10	-	-	0,50	0,10
	MSC11	-	-	1,00	0,10
	MSC12	-	-	2,00	0,10
	NMSCa	-	-	0,10	0,01
	NMSCb	-	-	-	0,01
	MS0	-	-	-	-

*** Sự hình thành phôi và tái sinh cây**

Sau 2 - 4 lần cấy chuyển như vậy, một số khối mô sẹo có sự hình thành và phát triển của phôi. Chúng tôi gọi môi trường nhân và duy trì mô sẹo cuối cùng được cấy chuyển khi phôi hình thành là môi trường cảm ứng tạo phôi. Như vậy

thì trong thí nghiệm này môi trường cảm ứng tạo phôi có thành phần giống như môi trường nhân và duy trì mô sẹo MS0. Sau khi phôi hình thành, tiếp tục cấy chuyển phôi lên môi trường nảy mầm phôi/tái sinh cây cũng là môi trường cơ bản (MS0) không có chất điều khiển sinh trưởng.

*** Ra cây**

Khi cây được 8 - 10cm thì tiến hành đưa cây ra điều kiện tự nhiên. Trước hết, những bình tam giác có cây được đưa ra điều kiện ánh sáng và nhiệt độ ngoài trời trong 3 ngày để cây thích nghi trước khi chuyển sang bầu đất. Ba công thức của bầu đất được thử nghiệm là 100% cát; 1/2cát:1/2 đất; và 1/3 đất:1/3 cát:1/3 trấu toàn tính. Sau 4 tuần thì chuyển cây sang chậu lớn chỉ chứa đất và chăm sóc theo quy trình của Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây có sợi. Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây tái sinh trong nhà lưới.

b) Kết quả tạo phôi soma

- Cảm ứng tạo mô sẹo

Đối với tất cả các giống bông nghiên cứu, mọi tổ hợp chất điều khiển sinh trưởng đều tạo mô sẹo tỉ lệ cao nhưng phát triển tương đối kém (Bảng 12).

Bảng 12. Ảnh hưởng của các tổ hợp hoóc môn sinh trưởng khác nhau lên sự hình thành mô sẹo và phôi soma của các giống bông SSR60F, 254 và VN36P

Loại tổ hợp	Môi trường	Loại mẫu vật	Số mẫu vật			Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)			Tỉ lệ mô sẹo tạo phôi (%)			Sự phát triển của mô sẹo		
			SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P
Tổ hợp loại 1	MS1	thân mầm	46	50	50	60	50	70	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	32	30	30	70	51	70	0	0	0	+	+	++
	MS2	thân mầm	49	50	50	80	66	82	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	32	30	30	75	72	83	0	0	0	++	+	++
	MS3	thân mầm	63	30	30	100	90	90	0	0	0	++	++	++
		lá mầm	32	50	50	75	95	100	0	0	0	++	++	++
	MS4	thân mầm	48	50	50	79	63	70	7	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	78	67	70	0	0	0	++	+	++
	MS5	thân mầm	35	50	50	78	79	71	8	0	0	+	+	++
		lá mầm	33	30	30	85	78	75	0	0	0	++	+	++
	MS6	thân mầm	30	30	30	100	80	80	0	0	0	+++	++	++
		lá mầm	34	50	50	95	79	90	0	0	0	+++	++	++
	MS7	thân mầm	37	50	50	75	53	69	0	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	87	54	81	0	0	0	++	+	++
	MS8	thân mầm	30	50	50	79	68	90	0	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	97	70	90	0	0	0	++	+	++
	MS9	thân mầm	30	30	30	79	77	100	0	0	0	+++	++	++
		lá mầm	32	50	50	82	88	90	0	0	0	+++	++	++

Tổ hợp loại 2	MSR1	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR2	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR3	thân mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR4	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	90	0	0	0	++	++	++
	MSR5	thân mầm	30	50	50	100	100	100	10	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR6	thân mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	++	++	+++
Tổ hợp loại 3	MSC1	thân mầm	45	50	50	100	98	100	12	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	90	100	0	0	0	+	+	+
	MSC2	thân mầm	45	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	100	90	0	0	0	+	+	+
	MSC3	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	++
	MSC4	thân mầm	45	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	84	100	0	0	0	+	+	+
	MSC5	thân mầm	45	50	50	100	95	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	97	100	0	0	0	+	+	+
	MSC6	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	50	50	100	100	90	0	0	0	+	+	++
	MSC7	thân mầm	45	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
	MSC8	thân mầm	45	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
	MSC9	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+	+	+
	MSC10	thân mầm	45	50	50	100	85	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	79	90	0	0	0	+	+	+
	MSC11	thân mầm	45	50	50	100	95	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	96	100	0	0	0	+	+	++
	MSC12	thân mầm	45	30	30	100	98	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	50	50	100	89	100	0	0	0	+	+	+

Số lượng dấu + chỉ sự phát triển của mô sẹo sau 4 tuần trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo; dấu cộng nhiều hơn chỉ ra sự phát triển tốt hơn về kích thước của khối mô sẹo..

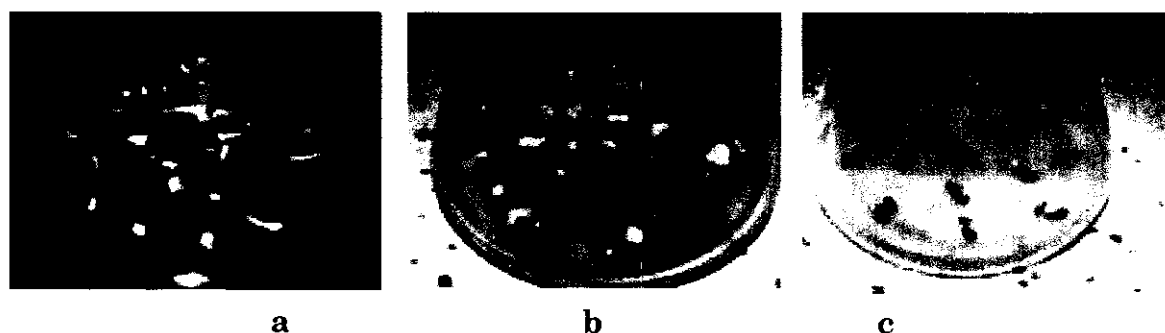
Sau 4 tuần, sự kết hợp 2,4-D và kinetin cho ra mô sẹo trắng và cứng (Hình 25) với tỉ lệ dao động từ 60 - 100% giữa các nồng độ. Nồng độ cao tương ứng với sự phát triển nhanh hơn và mạnh hơn của mô sẹo (nhiều dấu + hơn). Không có sự khác biệt rõ rệt giữa mô sẹo hình thành từ lá và mô sẹo hình thành từ thân mầm.

Sự kết hợp Kinetin và NAA luôn cho ra mô sẹo màu trắng và kèm theo nhiều rễ (Hình 25). Tỉ lệ tạo mô sẹo rất cao, tới 100% trên tất cả các nồng độ. Độ phát triển khá đồng đều giữa mô sẹo từ lá mầm và thân mầm, cũng như giữa các loại nồng độ của kinetin và NAA. Do đó, chưa kết luận được nồng độ nào là tốt nhất.

Mô sẹo phát triển mạnh ngay từ đầu không hoàn toàn có nghĩa là triển vọng tạo phôi cao về sau này. So với các tổ hợp, 2,4-D và kinetin, cho sự hình thành mô sẹo với tỉ lệ cao hơn và phát triển mạnh hơn.

Tổ hợp Zea và NAA luôn cho mô sẹo xám và hơi mọng nước (Hình 25). Nồng độ Zeatin càng cao thì mô sẹo càng ướt. Cũng như ảnh hưởng của tổ hợp Kin và NAA, 100% mẫu vật tạo mô sẹo. Tuy nhiên, trong cả 3 loại tổ hợp các chất điều khiển sinh trưởng thì tổ hợp Zea và NAA cho mô sẹo phát triển rất chậm và kém nhất. Cũng không có sự khác biệt rõ rệt giữa mô sẹo từ lá mầm và mô sẹo từ thân mầm.

Việc xác định tổ hợp và nồng độ chất điều khiển sinh trưởng nào là thích hợp nhất cho việc tạo mô sẹo có khả năng tạo phôi soma còn phụ thuộc vào kết quả tạo phôi khi mô sẹo được cấy chuyển. Cũng tương tự, sau đó chúng tôi mới có thể xác định được hình thái mô sẹo nào là biểu hiện triển vọng của khả năng tạo phôi và tái sinh. Theo một số nghiên cứu, hình thái mô sẹo biến đổi đa dạng trong quá trình nuôi cấy.



Hình 25. Sự hình thành mô sẹo trên một số môi trường cảm ứng tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy giống 254

a. trên môi trường có 2,4-D và Kin (MS4); b. trên môi trường có Kin và NAA (MSR11); c. trên môi trường có Zea và NAA (MSC8)

2.2.2.2. Nhân và duy trì mô sẹo

Trong quá trình nuôi cấy, một câu hỏi đặt ra là nên chọn môi trường nào để duy trì mô sẹo mà cho kết quả tạo phôi tốt nhất. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau khi cấy chuyển lên các loại môi trường nhân/duy trì mô sẹo thì mô sẹo phát triển theo 3 chiều hướng chính tương ứng với hình 26a, b và c. Nếu tiếp tục cấy chuyển lên môi trường vẫn giữ nguyên nồng độ chất điều khiển sinh trưởng thì mô sẹo nhân lên rất nhanh (Bảng 13, Hình 26a). Các loại mô sẹo có hình thái khác nhau đều trở nên xốp hơn, nhưng nhanh chóng ngả màu nâu xám, mọng nước và chết. Như vậy xu hướng phát triển quá nhanh này không thực sự tốt. Chẳng hạn như khi cấy chuyển mô sẹo hình thành trên MS1 lên chính MS1 sau 4

tuần, chỉ 53% mô sẹo sống sót, lần cấy chuyển thứ hai lên MS0 thì 26% sống sót. Đối với môi trường MS4 có nồng độ 2,4-D cao hơn thì tỉ lệ chết của mô sẹo càng cao hơn khi cấy chuyển lên chính MS4. Tỉ lệ mô sẹo sống sót cao nhất khi mô sẹo được cấy chuyển ngay lên môi trường MS0.

Khi cấy chuyển lên môi trường duy trì mô sẹo không có hoặc môn sinh trưởng như vậy hoặc lượng hoặc môn rất thấp (Bảng 13) thì mô sẹo tiếp tục phát triển, nhưng đặc biệt là ít mọng nước và ngả màu nâu. Hai hình thái điển hình là mô sẹo hơi xanh và cứng (Hình 26b) hoặc vàng nhạt và hơi xốp, dễ vỡ ra thành các hạt nhỏ (Hình 26c). Loại khối mô sẹo hơi xốp và vàng nhạt này khi tiếp tục được cấy chuyển lên môi trường duy trì mô sẹo MS0 thì vẫn tiếp tục phát triển tốt. Sau thời gian 1 năm thì hầu hết các loại mô sẹo của hầu hết các giống đều chết.

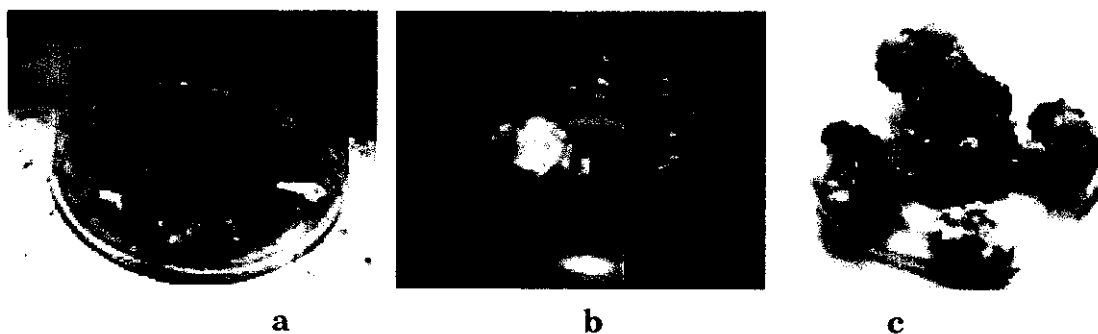
Bảng 13. Tỉ lệ mô sẹo sống sót sau khi cấy chuyển lên các môi trường nhân và duy trì mô sẹo

Môi trường cảm ứng mô sẹo	Môi trường cấy chuyển lần 1	Môi trường cấy chuyển lần 2	Số mô sẹo cấy chuyển	Mô sẹo sống sót sau lần cấy chuyển 1		Số mô sẹo sống sót sau lần cấy chuyển 2	
				Số lượng	tỉ lệ %	Số lượng	tỉ lệ %
MS1	MS1	MS0	19	10	53	5	26
	NMSa	MS0	20	13	65	10	50
	NMSb	MS0	18	13	72	9	50
	MS0	MS0	21	21	100	21	100
MS2	MS2	MS0	15	11	73	8	53
	NMSa	MS0	25	20	80	19	76
	NMSb	MS0	20	18	90	17	85
	MS0	MS0	21	21	100	21	100
MS3	MS3	MS0	23	10	43	3	13
	NMSa	MS0	24	18	75	16	67
	NMSb	MS0	24	17	71	14	58
	MS0	MS0	24	23	96	22	92
MS4	MS4	MS0	19	19	100	7	37
	NMSa	MS0	21	19	90	18	86
	NMSb	MS0	21	21	86	18	86
	MS0	MS0	19	19	100	19	100
MS5	MS5	MS0	20	15	75	5	25
	NMSa	MS0	20	18	90	16	80
	NMSb	MS0	20	18	90	16	80
	MS0	MS0	20	20	100	20	100
MS6	MS6	MS0	20	5	25	3	15
	NMSa	MS0	20	10	50	8	40
	NMSb	MS0	20	10	50	8	40
	MS0	MS0	20	15	75	15	75
MS7	MS7	MS0	20	18	90	10	50
	NMSa	MS0	20	20	100	20	100
	NMSb	MS0	20	20	100	20	100
	MS0	MS0	20	20	100	20	100

Chỉ riêng ở giống bông SSR60F, loại mô sẹo xốp và vàng nhạt dần dần xuất hiện phôi soma trên môi trường duy trì mô sẹo không có chất điều khiển sinh trưởng. Do đó môi trường MS0 cũng được gọi là môi trường cảm ứng tạo phôi.

Kết quả trên nói lên rằng điều thuận lợi là mô sẹo phát triển từ từ và dần dần hình thành phôi soma. Rất có thể mô sẹo sản sinh một lượng hoóc môn, khi cộng hưởng với lượng hoóc môn bổ sung trong môi trường nuôi cấy gây ức chế mô sẹo. Đây là đặc điểm khác biệt với rất nhiều đối tượng khác. Kinh nghiệm này đóng một vai trò rất quan trọng trong quá trình nuôi cấy cây bông. Một đặc điểm khác đáng chú ý là, mặc dù mô sẹo của các giống khác như 254, TM1, VN36P cũng có dạng triển vọng là vàng nhạt, tơi xốp và khô ráo, phát triển tốt trên MS0, nhưng không hề hình thành phôi soma. Điều này khẳng định thêm sự phụ thuộc vào kiểu gen của khả năng tái sinh cây bông là rất nghiêm ngặt. Đây thực sự là một trở ngại đối với công tác chuyển gen vào đối tượng này.

Mô sẹo từ cả thân và lá, ví dụ cho loại tổ hợp 1. (tổ hợp Kin và NAA) khi cấy chuyển như vậy thì tỉ lệ mô sẹo sống sót cao hơn nhưng vẫn thể hiện xu hướng là sức sống cao hơn khi cấy chuyển lên môi trường có ít chất điều khiển sinh trưởng hơn. Tổ hợp Zeatin và NAA khi cấy chuyển như vậy cho tỉ lệ mô sẹo sống sót rất thấp, bởi vì ngay trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo ban đầu, mô sẹo đã phát triển kém hơn trên hai loại tổ hợp chất điều khiển sinh trưởng trên, hình thái mô sẹo rất mỏng nước, nên chỉ sau lần cấy chuyển thứ nhất thì đã có rất nhiều mô sẹo chết.



Hình 26. Nhân và duy trì mô sẹo của giống VN 36P

a. trên môi trường giữ nguyên nồng độ 2,4-D và Kin so với môi trường cảm ứng mô sẹo; b, c. trên môi trường loại bỏ hoàn toàn chất điều khiển sinh trưởng so với môi trường cảm ứng mô sẹo, trong đó b: loại mô sẹo cứng, hơi xanh. c: loại mô sẹo xốp, hơi vàng

- Sự hình thành phôi và tái sinh cây

Tỉ lệ loại mô sẹo có sự hình thành phôi như miêu tả ở trên rất thấp, trung bình khoảng 10%, mặc dù tỉ lệ mô sẹo hóa rất cao. Loại mô sẹo có cảm ứng hình

thành phôi chỉ thu được trên môi trường nhân/duy trì mô sẹo hay môi trường cảm ứng phôi không có chất điều khiển sinh trưởng. Chỉ mô sẹo từ thân mầm mới có hiện tượng cảm ứng tạo phôi, mặc dù quá trình hình thành và phát triển rất giống với mô sẹo bắt nguồn từ mẫu vật lá mầm. Những kết quả này rất thống nhất với nghiên cứu trước đây.

Trong một khối mô sẹo có nhiều dạng phôi khác nhau vào cùng một thời điểm: phôi ở giai đoạn hình cầu, hình trái tim, nảy mầm. Một khối mô sẹo có thể hình thành hàng chục phôi.

Các mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma bắt đầu hình thành trên các môi trường MS4, MS5 và MS9; MSR 5, MSC5 và MSC7. Vậy các nồng độ triển vọng dùng để tạo mô sẹo có khả năng tạo phôi là 0,1-0,4mg/L 2,4-D + 0,2-0,4mg/L kinetin; 0,5mg/L kinetin + 2,5mg/L NAA; và 0,1-1mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA. Điều này nói lên rằng cả 3 sự kết hợp hoóc môn sinh trưởng nếu được điều chỉnh ở nồng độ thích hợp, trong điều kiện nuôi cấy tối ưu như lượng đường, vitamin, pH, ánh sáng, nhiệt độ... sẽ có thể cho phép xây dựng một qui trình tái sinh tối ưu. Việc nâng cao tỉ lệ tạo phôi là điều rất cần thiết cho công tác chuyển gen.

- Tái sinh và ra cây

Cũng trên chính môi trường MS0 phôi nảy mầm thành cây con. Tuy nhiên, có khá nhiều cây (30%) có hình thái khác thường, có thể là kết quả của biến dị soma trong quá trình mô sẹo hóa. Quá trình ra cây chứng minh rằng bầu đất gồm: 1đất:1cát:1trấu là thích hợp nhất để ra cây. Tỉ lệ cây sống sót là 90%.

- Kết luận về qui trình tái sinh cây bông qua phôi soma

Đã nghiên cứu ảnh hưởng của các tổ hợp các chất điều khiển sinh trưởng lên sự hình thành mô sẹo của 7 giống bông. Mặc dù quá trình hình thành và phát triển mô sẹo của các giống là như nhau, sự hình thành phôi chỉ được quan sát thấy ở giống SSR60F và giống Coker 310, là hai giống có khả năng tái sinh cao. Chỉ mô sẹo từ thân mầm mới cảm ứng tạo phôi. Có thể sử dụng ít nhất 3 loại tổ hợp chất điều khiển sinh trưởng để tạo mô sẹo, nhưng việc tìm ra loại tổ hợp nào là tối ưu cho cảm ứng phôi và tái sinh cây còn là công việc nghiên cứu tiếp theo. Thiết lập được quy trình cơ bản tái sinh cây bông như sau: Mẫu vật thân mầm của cây non 10 - 15 ngày tuổi được đặt lên môi trường cảm ứng mô sẹo 4 tuần, sau đó cấy chuyển nhiều lần trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng đến khi phôi hình thành. Tiếp tục duy trì sự phát triển của phôi đến khi cây tái sinh. Chuyển cây sang bầu đất chứa 1/3 cát, 1/3 đất và 1/3 trấu toàn tính. Sau cùng chuyển cây sang chậu đất và chăm sóc bình thường. Môi trường nhân và

duy trì mô sẹo, môi trường cảm ứng tạo phôi và môi trường cho phôi nảy mầm tái sinh cây đều sử dụng chung môi trường cơ bản không có chất điều khiển sinh trưởng. Có 30% cây tái sinh biểu hiện biến dị soma trong ống nghiệm. Tỷ lệ ra cây của cây tái sinh bình thường là 90%. Kết quả mở ra triển vọng cho phép chuyển gen thông qua *Agrobacterium* trong một tương lai gần.



Hình 27. Tái sinh cây bông giống SSR qua giai đoạn mô sẹo

A. Cây bông gieo hạt sau 7 ngày; B. Đoạn thân trên môi trường tạo mô sẹo; C. Mô sẹo hình thành; D. Mô sẹo chất lượng kém; E. Mô sẹo có khả năng tạo phôi; F. Mô sẹo đã phân hóa phôi; G, H, I. Phôi nảy mầm; K. Cây phát triển từ phôi soma; L. Cây hoàn chỉnh từ phôi soma

3.2.3. Xây dựng Quy trình chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm

3.2.3.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

a) Vật liệu

Giống bông: Tại trại thực nghiệm đã dùng các giống bông sâu dây để chuyển gen kháng sâu: TM1, D16-2, LRA, C118, VN36P và 254. Khi triển khai lớn tại Nha Hồ các giống bông được sử dụng là: TM1, D16-2, LRA, C118, VN36P và MUC9 nhận gen kháng sâu và 3 giống TM1, CS95 và SH4 nhận gen chịu hạn.

Gen chuyển: Gen kháng sâu *cryIA(c)* và *cryIA(b)* được thiết kế trong vector pCAMBIA1300 kèm gen chỉ thị kháng kháng sinh hygromycine (*hpt*) và pCAM2300 kèm theo gen chỉ thị kháng Kanamycine và gen chịu hạn TPS và P5CS cũng được thiết kế trong vector trên.

Các công thức tiêm bao gồm:

+ 5 nồng độ: 2,5µg/ml; 5,0µg/ml; 10,0µg/ml; 15,0µg/ml và 20,0µg/ml.

+ Gen chịu hạn TPS và P5CS: Nồng độ 10,0µg/ml.

Dung dịch kháng sinh giám định: Kháng sinh hygromycine (của hãng Merk, nồng độ gốc 420mg/ml), pha ở 3 nồng độ xử lý: 55mg/l; 65mg/l và 75mg/l có bổ sung thêm 5,0% Tween 20.

b) Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện qui mô nhỏ tại nhà lưới của Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội. Các giống được gieo theo sơ đồ thí nghiệm và được đánh dấu nghiêm ngặt.

Sau đó triển khai thí nghiệm chuyển gen qui mô lớn tại Viện NC Cây Bông và cây có sợi Nha Hồ, Ninh Thuận

Cây bông được gieo trồng, chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh theo quy trình sản xuất của ngành trồng bông.

Phương pháp tiến hành: Bắt đầu khi cây bông nở hoa đến lúc hoa rộ. Tiêm vào ngày râm mát, từ 7^h -10^h sáng. Chọn hoa vừa nở ngày hôm trước, vặt bỏ cánh hoa và phần vôi nhụy sát bầu hoa. Dùng kim (loại micropipet dung tích 10µl) hút dung dịch ADN đã pha (tuyệt đối không để bọt khí trong xi lanh) tiêm vào bầu hoa; sau khi tiêm xong, nhỏ 1 - 2 giọt dung dịch khử trùng và giữ đậu quả lên vết tiêm, buộc dây và biển đánh dấu. Động tác rút dịch và tiêm tiến hành cho từng hoa một, sau đó rửa sạch kim trước khi chuyển sang hoa khác. Khi quả nở, tiến hành thu hoạch theo từng công thức, cán tách xơ, đưa vào bảo quản kho lạnh.



Hình 28. Bầu nhụy sau khi vật cánh hoa và cắt vòi nhụy



Hình 29. Đưa kim tiêm và bầu nhụy



Hình 30. Bắt đầu đẩy xy lanh tiêm



Hình 31. Đã đẩy xong xy lanh tiêm

3.2.3.2. Kết quả chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm

a) Thu hoạch hạt bông T0

Sau khi tiến hành thí nghiệm, chúng tôi thu hạt theo từng quả tách bông và đánh dấu tên dòng sau đó bảo quản cho các thí nghiệm chọn lọc tiếp theo.



Hình 32. Thu hoạch hạt bông T0 sau thí nghiệm vi tiêm

Bảng 14. Số dòng bông và số lượng hạt thu được của các giống sau vi tiêm thu được tại Trại Thực nghiệm Cổ Nhuế, Hà Nội năm 2001 - 2002

Tên giống	Số dòng	Tổng số hạt
Cây biến nạp gen <i>cryIA(b)</i>		
TM1	8	189
LRA5116	5	130
C118A	4	64
SB1	2	18
D16-2	3	58
VN36P	4	101
254	5	90
Cây biến nạp gen <i>cryIA(c)</i>		
TM1	10	132
LRA5116	3	56
C118A	7	102
SB1	8	116
D16-2	4	60
VN36P	9	173
254	6	90

Với thí nghiệm qui mô lớn tại Viện NCB&CCS Nha Hố, Ninh Thuận đã thu được những kết quả sau:

b) Tỷ lệ đậu quả sau tiêm

Thời gian tiêm kéo dài 23 ngày, từ lúc bắt đầu nở hoa đến hoa nở rộ (khoảng 57 đến 80 ngày sau gieo).

Tổng số hoa đã tiêm được là 25.442, tổng số quả đậu là 18.737 quả. Như vậy, tỷ lệ đậu quả trung bình khá cao (73,6%), kém không đáng kể so với đối chứng thụ phấn bình thường (78,3%). Trên các công thức, tỷ lệ đậu quả biến động từ 61,1 đến 82,1%; không chênh lệch nhau nhiều giữa các giống trên cùng nồng độ (trung bình 70,8 - 75,5%) và giữa các nồng độ trên cùng một giống (trung bình 70,0 - 79,1%) (Bảng 15).

Bảng 15. Số hoa, quả và tỷ lệ đậu quả của các công thức

Giống bông	Số hoa tiêm	Số quả tiêm	Tỷ lệ đậu quả (%)						
			Nồng độ tiêm (µg/ml)						Đối chứng
			2,5	5,0	10,0	15,0	20,0	TB	
TM1	4.905	3.881	79,1	80,6	76,5	79,7	79,8	79,1	84,7
D16-2	4.228	3.004	61,5	77,8	74,4	77,4	64,3	71,1	77,2
LRA	5.082	3.765	82,1	76,7	71,7	70,3	70,9	74,1	79,4
C118	5.183	3.650	75,5	62,1	76,5	77,3	61,1	70,4	74,1
VN36P	3.818	2.792	79,3	72,3	68,3	69,8	75,3	73,1	76,1
MCU9	2.226	1.645	-	-	-	74,5	73,2	73,9	-
Tổng	25.442	18.737	-	-	-	-	-	-	-
Trung bình	4.074	3.123	75,5	73,9	73,5	74,8	70,8	73,6	78,3

Tương tự, thống kê trên tất cả các nồng độ tiêm, kết quả cho thấy tỷ lệ đậu quả cao, biến động từ 39,4 đến 88,5%; đồng thời, không có sự sai khác có tính quy luật theo giờ tiêm trong ngày giữa các giống (trung bình từ 61,7 đến 71,2%) (Bảng 16).

Bảng 16. Tỷ lệ đậu quả theo giờ tiêm/ngày của các công thức

Giờ tiêm	Giống bông						Trung bình
	TM1	D16-2	LRA	C118	VN36P	MCU9	
7,00-7,15	88,5	40,2	57,5	-	68,8	-	63,8
7,16-7,30	84,8	60,2	74,6	62,9	69,4	75,5	71,2
7,31-7,45	70,8	73,2	68,8	58,4	62,8	62,4	66,1
7,46-8,00	79,5	84,5	65,1	64,4	62,7	59,7	69,3
8,01-8,15	73,8	54,9	62,2	61,6	71,2	68,6	65,4
8,16-8,30	79,3	58,7	66,1	68,5	75,3	62,4	68,4
8,31-8,45	75,8	60,9	67,4	76,6	72,2	73,5	71,1
8,46-9,00	62,9	52,5	77,8	59,3	65,5	63,7	63,6
9,01-9,15	68,8	63,1	63,0	71,9	64,6	60,9	65,4
9,16-9,30	73,0	63,1	73,8	62,9	74,4	67,7	69,2
9,31-9,45	63,3	73,1	62,4	39,4	52,6	79,1	61,7
9,46-10,00	73,3	67,2	65,4	53,2	73,7	69,9	67,1

Quan sát ngoài đồng cho thấy tác động của kim tiêm có một số ảnh hưởng nhất định đến sự thụ phấn thụ tinh và phát triển quả bình thường. Một mặt, có thể gây tổn thương noãn, làm giảm rõ rệt số hạt/quả (trung bình chỉ đạt 7,9 - 14,8 hạt) so với đối chứng (27,5 - 29,3 hạt); mặt khác, gây tổn thương cả múi quả và cũng làm giảm hẳn số múi/quả (trung bình 2,5 - 3,2 múi) so với đối chứng (4,0 -

4,2 múi) (Bảng 17).

- Tỷ lệ quả dị hình

Chính những tổn thương trên đây dẫn đến hiện tượng tăng số quả dị hình ở các công thức tiêm chuyển gen (73,9 - 95,7%) so với tỷ lệ quả dị hình tự nhiên (do thụ phấn không đều) trên các công thức đối chứng (4,3 - 13,0%) (Bảng 17). Trong sáu giống, C118 có tỷ lệ quả dị hình thấp hơn (73,9 - 82,6%) so với các giống còn lại (82,6 - 100,0%) (Bảng 17).

Bảng 17. Tỷ lệ quả dị hình, số múi/quả và số hạt/quả, và của các công thức

Chỉ tiêu	Nồng độ tiêm(μ g/ml)	Giống bông					
		TM1	D16-2	LRA	C118	VN36P	MCU9
Tỷ lệ quả dị hình (%)	2,5	95,7	100,0	91,3	78,3	91,3	-
	5,0	87,0	87,0	95,7	82,6	87,0	-
	10,0	91,3	87,0	91,3	73,9	91,3	-
	15,0	95,7	91,3	91,3	78,3	91,3	91,3
	20,0	91,3	82,6	93,9	73,9	91,3	87,0
	Trung bình	92,2	89,6	92,7	77,4	90,4	89,1
	Đối chứng	13,0	13,0	4,3	8,7	8,7	-
Số múi/quả	2,5	2,6	2,8	2,6	3,0	2,7	-
	5,0	3,0	2,8	2,7	3,0	2,4	-
	10,0	2,7	3,0	3,3	3,3	2,3	-
	15,0	2,7	2,8	2,7	3,3	2,5	3,0
	20,0	2,7	2,8	3,2	3,2	2,6	3,0
	Trung bình	2,7	2,9	2,9	3,2	2,5	3,0
	Đối chứng	4,0	4,1	4,2	4,1	4,2	-
Số hạt/quả	Trung bình	9,4	9,9	13,0	14,8	7,9	12,9
	Đối chứng	27,5	28,3	28,2	29,3	28,5	27,9



Hình 33. Ảnh hưởng của vi tiêm đến quả bông

- Số lượng hạt thu được

Mặc dù động tác tiêm có ảnh hưởng nhất định đến sự hình thành quả và hạt, giảm số múi và số hạt/quả; tuy nhiên nhờ số lượng hoa tiêm khá lớn và tỷ lệ đậu quả cao nên số lượng hạt thu được khá lớn trên các giống. Trong đó, số hạt tiêm chuyển gen kháng sâu là 212.763 hạt/5 giống (Bảng 18) và tiêm chuyển gen chịu hạn là 4.000hạt/3 giống.

Bảng 18. Tổng số hạt thu được sau tiêm của các công thức

Giống	Nồng độ tiêm (µg/ml)					Tổng
	2,5	5,0	10,0	15,0	20,0	
* Chuyển gen kháng sâu						
TM1	7.032	7.003	7.600	8.194	6.735	36.564
D16-2	5.927	8.147	5.920	4.671	5.107	29.772
LRA	9.539	7.634	8.533	9.125	14.076	48.907
C118	9.892	12.708	12.809	9.379	9.240	54.028
VN36P	4.869	5.841	4.145	4.218	3.122	22.195
MCU9	-	-	-	9.977	11.320	21.297
Tổng	37.259	41.333	39.007	45.564	49.600	212.763
* Chuyển gen chịu hạn						
TM1	-	-	700	-	-	700
CS95	-	-	1.500	-	-	1.500
SH4	-	-	1.800	-	-	1.800
Tổng	-	-	4.000	-	-	4.000

c) Kết quả chọn lọc cây bông chuyển gen qua ống phẩn T1 bằng phương pháp test kháng sinh trên lá

- Phương pháp

Toàn bộ số hạt thu được sau khi chuyển gen *cryIA(b)*, *cryIA(C)* bằng phương pháp vi tiêm của các giống bông TM1, LRA5116, C118A, SB1, D16-2, VN36P, 254.

Hạt bông được loại bỏ hạt lép, sâu bệnh, sau đó gieo trực tiếp trên nền giá thể (đất, cát, trấu) theo từng hàng. Khi cây con đạt 2 lá thật, chúng tôi tiến hành Test kháng sinh trên lá. Sử dụng Pipetman nhỏ 10µm dung dịch kháng sinh với nồng độ thích hợp (Kanamycine 500mg/L, Hygromycine 75mg/L) lên mặt trên của lá, tránh nhỏ vào gân lá. Sau khi chọn lọc lần 1, các cây dương tính được tiếp tục chọn lọc lần 2 và lần 3. Biểu hiện tính kháng: Sau 5 ngày nhỏ kháng sinh trên lá, tại vết nhỏ xuất hiện hình đốm cháy màu vàng nhạt. Các cây không có biểu hiện này được tiếp tục chọn lọc các lần sau.

Bảng 19. Kết quả sàng lọc cây bông chuyển gen sau vi tiêm bằng Test kháng sinh trên lá

Giống	Số hạt	Số hạt nảy mầm	Tỉ lệ nảy mầm	Số cây dương tính sau 3 lần thử Kn	
Test Kanamycine (Kn) cho cây biến nạp gen <i>CryIA(b)</i> bằng phương pháp vi tiêm					
TM1	189	152	80.42%	0	
LRA5116	130	90	69.23%	0	
C118A	64	55	85.94%	0	
SB1	18	15	83.33%	0	
D16-2	58	45	77.59%	0	
VN36P	101	63	62.38%	0	
254	90	68	75.56%	0	
Tổng	650	488	75.08%	0	
Giống	Số hạt	Số hạt nảy mầm	Tỉ lệ nảy mầm	Số cây dương tính sau 3 lần thử Hgr	Tổng số hạt thu được
Test Hygromycine (Hyg) cho cây biến nạp gen <i>CryIA(c)</i> bằng phương pháp vi tiêm					
TM1	132	91	68.94%	17	273
LRA5116	56	38	67.86%	19	912
C118A	102	89	87.25%	6	150
SB1	116	108	93.10%	62	1894
D16-2	60	40	66.67%	34	847
VN36P	173	158	91.33%	34	1270
254	154	126	81.82%	21	801
Tổng	793	650	81.97%	193	6147

- Kết quả đánh giá qui mô nhỏ tại Trại thực nghiệm Cổ Nhuế

Sau 3 lần chọn lọc, toàn bộ số cây có phản ứng dương tính được chúng tôi đánh dấu chăm sóc và thu hạt làm nguyên liệu cho công việc chọn lọc tiếp theo.

- Kết quả đánh giá qui mô lớn tại Nha Hố, Ninh Thuận

Trên cơ sở qui trình giám định do Viện CNSH Hà Nội đề nghị với nồng độ kháng sinh hygromycine chuẩn là 75mg/l, chúng tôi tiến hành thử ở các nồng độ tăng dần 55; 65 và 75mg/l để tiến hành loại bỏ dần các cây có biểu hiện âm tính đối với kháng sinh. Sau đó, tự thụ lấy hạt để cung cấp cho các chu kỳ giám định sau.

Do số lượng hạt quá lớn, quá trình loại dần chỉ được thực hiện theo từng giống ở tất cả các nồng độ tiêm chuyển gen thu được. Hiện tại, việc giám định cũng chỉ mới tiến hành đối với hạt chuyển gen kháng sâu trên các giống D16-2, VN36P ở tất cả 5 nồng độ ADN tiêm và một phần hạt của giống MCU9 ở nồng độ tiêm IV.

Dung dịch xử lý rễ trên lá bông là một chấm tròn. Sau khoảng 2 - 3 giờ, giọt dung dịch khô đi, để lại một vết tròn sáng bóng. Sau đó, triệu chứng dần dần có

biểu hiện khác biệt.

Đối với cây dương tính, vết xử lý vẫn có màu sáng bóng, sau đó nhạt dần và trở lại bình thường, mô lá vẫn có màu xanh và không bị chết.

Đối với cây âm tính, sau 24 giờ, vết tròn chuyển sang màu xanh trắng; sau hai ngày, chuyển dần sang màu nâu nhạt; đến ngày thứ 3, chuyển sang màu nâu đậm và tế bào chết khô dần. Kể từ ngày thứ 4 trở đi, vết xử lý có dạng điển hình khô, hình tròn, màu trắng ở giữa và viền màu nâu đậm xung quanh.

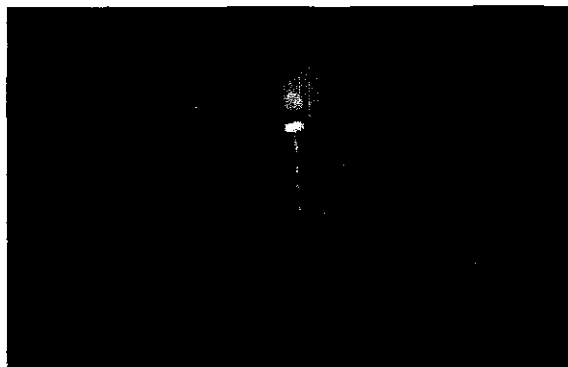
Tỷ lệ cây biểu hiện dương tính/âm tính: Quan sát ở các nồng độ kháng sinh xử lý, tỷ lệ cây có biểu hiện dương tính thu được ứng với các nồng độ ADN tiêm không có sự khác biệt có tính quy luật trên hai giống D16-2 và VN36P. Tuy nhiên, so sánh giữa các giống theo từng nồng độ, tỷ lệ cây dương tính ở 2 giống D16-2 và MCU9 thấp hơn so với giống VN36P (Bảng 20). Theo chúng tôi, nguyên nhân có lẽ là do khác nhau về đặc điểm cấu tạo hình thái của lá, dẫn đến mức độ thấm dung dịch kháng sinh không giống nhau (giống VN36P lá dày hơn và có nhiều lông trên bề mặt hơn so với 2 giống D16-2 và MCU9).

Bảng 20. Tỷ lệ cây có phản ứng dương tính đối với các nồng độ kháng sinh hygromycine của các công thức

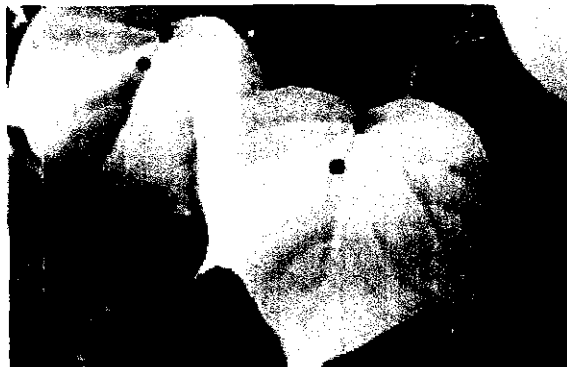
Nồng độ tiêm (µg/ml)	Số cây xử lý	55mg/l		65mg/l		75mg/l	
		Số cây dương tính	Tỷ lệ (%)	Số cây dương tính	Tỷ lệ (%)	Số cây dương tính	Tỷ lệ (%)
* Giống D16-2							
2,5	4.757	3.932	82,7	3.464	72,8	827	17,4
5,0	6.516	3.877	59,5	3.532	54,2	617	9,5
10,0	4.879	3.776	77,4	3.222	66,0	372	7,6
15,0	3.769	2.171	57,6	1.720	45,6	334	8,9
20,0	4.259	2.670	62,7	2.216	52,0	342	8,0
Tổng/TB	24.180	16.426	67,9	14.154	58,5	2.492	10,3
* Giống MCU9							
15,0	1.902	985	51,8	551	29,0	51	2,7
* Giống VN36P							
2,5	3.063	2.920	95,3	2.172	70,9	1.399	45,7
5,0	3.546	3.437	96,9	2.843	80,2	2.360	66,6
10,0	2.395	2.348	98,0	1.994	83,3	1.514	63,2
15,0	2.322	2.275	98,0	1.772	76,3	1.446	62,3
20,0	1.790	1.759	98,3	1.493	83,4	1.256	70,2
Tổng/TB	13.116	12.739	97,1	10.247	78,1	7.975	60,8

Đáng lưu ý là khi tăng nồng độ kháng sinh, tỷ lệ cây dương tính trên các công thức có xu hướng giảm dần. Mặc dù vậy, ở các nồng độ, kể cả nồng độ cao nhất là

75mg/l, tỷ lệ này vẫn còn khá cao trên cả 3 giống D16-2, MCU9 và VN36P (trung bình 10,3; 2,7 và 60,8% tương ứng) (Bảng 20); cao hơn nhiều so với các kết quả nghiên cứu đã công bố trước đây của các tác giả Trung Quốc (0,1 - 0,2%).



Hình 34. Triệu trứng sau ba ngày



Hình 35. Triệu trứng sau bốn ngày

c) Kết quả chọn lọc cây bông chuyển gen qua ống phần T1 bằng phương pháp gieo hạt trực tiếp trên môi trường chứa hygromycin

- Phương pháp tiến hành

Dựa vào kết quả xác định nồng độ kháng sinh chọn lọc cho từng giống bông, chúng tôi tiến hành chọn lọc cây sau vi tiêm của lô thí nghiệm tại Viện CNSH (Phụ lục 1).. Nguyên liệu thử là hạt T2 của các dòng bông thu được từ cây dương tính sau khi sàng lọc trên lá của các giống: TM1, SB1. VN36P, LRA, 254, D16-2, C118.



Hình 36. Quy trình sàng lọc cây chuyển gen

1. Hạt bông chuyển gen/ MS+Hgro; 2. ĐST trên môi trường khác nhau; 3. Hạt bông vi tiêm và giống gốc/MS; 4. Đỉnh sinh trưởng chọn lọc/MS+Hgro; 5. Cây chuyển sang môi trường tạo rễ; 6. Ra cây sau chọn lọc; 7. ĐST của giống gốc trên môi trường chọn lọc

Khử trùng đặt hạt: Hạt giống bông SSR60 và VN36P đã đốt lông áo bằng axit H_2SO_4 đậm đặc, được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 2 phút, tiếp theo lắc

trong dung dịch javen 60% trong 20 phút và rửa 5 lần bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng thấm khô hạt bằng giấy lọc khử trùng, tách vỏ và đặt hạt trên các môi trường chứa 50 mg/l hygromycin

Chọn lọc: Sau 21 ngày cấy trên môi trường có kháng sinh chọn lọc, những cây bông có khả năng ra rễ được lấy ra loại bỏ 2 lá mầm, loại bỏ phần gốc đen, cấy sang môi trường kháng sinh mới. Cứ hai tuần cấy chuyển một lần. Sau hai lần cấy chuyển những cây sống sót và tiếp tục ra rễ được chuyển sang môi trường nhân cây. Cây phát triển tốt tiến hành thu lá, tách ADN, chạy PCR để chọn lọc cây mang gen.

- Kết quả chọn lọc kháng hygromycin

Đã chọn được một số dòng bông của các giống D16-2, LRA, 254 sau 3 lần cấy chuyển trên môi trường chọn lọc.

D16-2 : 2 dòng (tổng số có 5 cây)

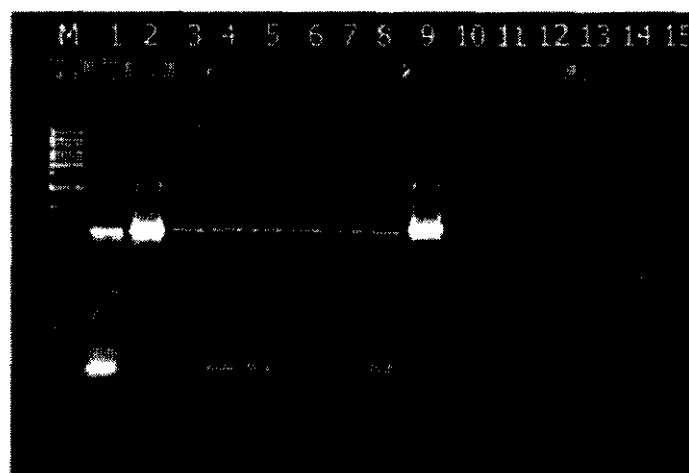
LRA: 1 dòng (tổng số có 1 cây)

254: 5 dòng (tổng số có 16 cây)

Các dòng bông này được chúng tôi tách chiết ADN và kiểm tra sự có mặt của gen đã chuyển vào bằng kỹ thuật PCR.

c) Sàng lọc cây bông chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Sau khi tiến hành tách chiết ADN và chạy PCR với mỗi đặc hiệu, chúng tôi đã thu được 6 cây thuộc giống 254 có phản ứng dương tính. Các giống khác tiếp tục theo dõi để thu lá và tách chiết ADN cho phản ứng PCR để kiểm tra.



Hình 37. Kết quả PCR các dòng bông chuyển gen

M: Maker 1kb; 1: Đối chứng dương là bông chuyển gen CS95; 2,9: đối chứng dương là plasmid; 3-8: các dòng bông chuyển gen giống 254; 10-15: các dòng bông chuyển gen giống 254

3.2.4. Kết luận và đề nghị

1. Hoàn thiện quy trình tái sinh cây bông thông qua đa chồi của 9 giống bông (LRA, 254, VN36P, C118, D16-2, TM1, SSR, Cooker, SB1).
2. Hoàn thiện quy trình tái sinh cây bông thông qua phôi soma từ mô sẹo của các giống bông: SSR và Cooker 310.
3. Xây dựng quy trình vi tiêm chuyển gen trực tiếp vào noãn thông qua ống phần bằng vi tiêm: Tiêm chuyển gen trực tiếp vào noãn qua ống phần của hoa sau nở một ngày không làm giảm đáng kể tỷ lệ đậu quả, nhưng gây tổn thương noãn, múi quả, làm giảm số hạt, số múi/quả và quả dị hình. Thời gian tiêm khác nhau trong buổi sáng và nồng độ ADN tiêm khác nhau có ảnh hưởng không rõ rệt và không có tính quy luật đến tỷ lệ đậu của quả tiêm.
4. Đã triển khai với qui mô nhỏ tại Cổ Nhuế Hà Nội và triển khai rất lớn tại Nha Hố, Ninh Thuận thu được tổng cộng trên 210.000 hạt bông vi tiêm chuyển gen kháng sâu và 4000 hạt tiêm chuyển gen chịu hạn thế hệ T0.
5. Sau khi sàng lọc đã nhận được 6147 hạt bông T1 chuyển gen kháng sâu của 6 giống và bước đầu tìm ra 6 cây thế hệ T2 thuộc giống 254 có phản ứng PCR dương tính. Ở quy mô thí nghiệm lớn tại Viện nghiên cứu cây Bông Nha Hố, đã thu được 11.000 hạt chuyển gen kháng sâu thế hệ T1 của ba giống D16-2, VN36P, MUC9 sau khi xử lý dung dịch kháng sinh trên lá ở các nồng độ 55; 65 và 75mg/l.
6. Những dòng bông dương tính qua sàng lọc sẽ được dùng làm nguyên liệu để phân tích sinh học phân tử, thử tính kháng sâu và theo dõi các đặc điểm nông sinh học và làm nguyên liệu lai tạo giống cho sản xuất giống bông lai F1 mang tính kháng sâu.
7. Chuyển gen *vip* kháng sâu vào các giống bông thông qua *Agrobacterium tumefaciens* để tạo bông kháng sâu thế hệ mới.

3.3. KẾT QUẢ TẠO DÒNG CÂY HỒNG CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU

3.3. Kết quả Tạo dòng cây hồng chuyển gen kháng sâu

3.3.1. Cơ sở khoa học và thực hiện của việc chuyển gen vào cây hồng

3.3.2. Hệ thống tái sinh cây hồng

3.3.2.1. Nguyên liệu và phương pháp

3.3.2.2. Kết quả xây dựng về hệ thống tái sinh cây hồng

3.3.2.3. Kết quả đánh giá chất chọn lọc phosphinothricin (PPT)

3.3.3. Hoàn thiện quy trình chuyển gen vào cây hồng

3.3.3.1. Nguyên liệu và phương pháp

3.3.3.2. Kết quả chuyển gen ở cây hồng

3.3.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây hồng

Cây hồng (*Paulownia*) có nguồn gốc từ vùng Đông Á, được trồng nhiều trên thế giới như ở Trung Quốc, Nhật Bản, Bắc Mỹ và Châu Âu. Đây là cây chống chịu khô hạn, giữ đất tốt và có giá trị kinh tế cao nhờ gỗ chắc, có vân đẹp, khó biến dạng bởi thời tiết, trong đó đặc điểm nổi bật là sinh trưởng rất nhanh, sau 6 năm trồng có thể khai thác gỗ. Gỗ được dùng làm đồ trang trí nội thất, đồ thủ công mỹ nghệ và nhạc cụ. Có thể xem cây hồng vừa có tác dụng bảo vệ môi trường, phủ xanh đồi trọc vừa mang lại nguồn kinh tế cao. Tuy nhiên, lá cây lại rất lớn, tỉ lệ đậm cao có thể dùng làm thức ăn gia súc nên thường hay bị các côn trùng phá hoại làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây.

Đặc biệt đây là cây rừng tán lá rộng nên việc chăm sóc và phòng trừ sâu rất khó khăn, để tạo cây hồng kháng sâu bằng phương pháp lai tạo truyền thống càng khó khăn hơn vì đây là cây lâu năm đồng thời rất khó tìm được dòng cây hồng kháng sâu sẵn trong tự nhiên. Do đó, để nhanh chóng tạo được cây hồng có tính kháng sâu cao, chúng tôi đã dùng kỹ thuật di truyền để chuyển gen kháng sâu vào cây hồng bình thường. Có nhiều phương pháp để chuyển gen, chúng tôi nhận thấy phương pháp phổ biến và phù hợp với điều kiện thiết bị tại Việt Nam là sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để tiến hành chuyển gen kháng sâu vào cây.

3.3.2. Hệ thống tái sinh cây hồng

3.3.2.1. Nguyên liệu và phương pháp

a) Nguyên liệu

Sử dụng giống cây hồng (*Paulownia fortunei*). Cây trong ống nghiệm được dùng làm nguyên liệu cho việc xây dựng hệ thống tái sinh cây hồng.

b) Phương pháp

Tái sinh từ mảnh lá: để tái sinh chồi từ mảnh lá, các cây con trong ống nghiệm cao khoảng 5 - 6cm với 3 - 5 cặp lá được sử dụng. Các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1- 2 cm² đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ cuống: các cuống lá được cắt với chiều dài khoảng 5 - 10mm đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ thân cây: các đoạn thân cây với chiều dài khoảng 3 - 5mm được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy MS (3) chứa 30g/l đường, 9 g/l Agar với sự hiện diện của các chất kích thích sinh trưởng theo tổ hợp là BA (1, 5, 10 mg/l) và NAA (0,1- 0,5- 1mg/l). Mỗi bình tam giác chứa khoảng 6 - 8 mẫu và mỗi nghiệm thức trung bình khoảng 30 mẫu. Các mẫu được đặt trong điều kiện 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 27- 28 °C. Sau 3 tuần cấy truyền một lần.

Tái sinh từ phương pháp cắt lớp mỏng tế bào: Lớp mỏng tế bào được cắt ở những vị trí khác nhau của cây, gồm lát cắt ngang (dày khoảng 0,5 - 2mm) và lát cắt dọc (dày khoảng 0,5-2mm, dài khoảng 2 - 5mm).

- + Vị trí cắt mẫu: cuống lá, phiến lá, gân lá, đốt thân.
- + Dùng dao cắt qua các vị trí khác nhau của cây với lát cắt ngang và dọc, dao lam được vô trùng với Hypochlorit calci và rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng.
- + Dùng đĩa petri nhựa vô trùng, cấy mẫu vào petri 60mm, petri được dán kín bằng một lớp parafilm.
- + Mẫu invitro dùng để thí nghiệm được nhân giống bằng cách cắt đoạn có đỉnh sinh trưởng hoặc chồi nách, các mẫu này được cấy trong bình tam giác 250ml, đầy bằng giấy trong điều kiện chiếu sáng 10 giờ/ngày. Sau 30 ngày cấy, mẫu được dùng để thực hiện lát cắt mỏng. Mỗi đĩa petri được đặt 7 mẫu và các mẫu cắt không có đỉnh sinh trưởng. Đối với đốt cuống lá được cắt ở vị trí giữa chồi nách và lá.

3.3.2.2. Kết quả xây dựng hệ thống tái sinh cây hồng

a) Tái sinh chồi từ mảnh lá

Các mẫu lá với kích thước khoảng 2cm² được đặt trong môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả tái sinh sau 5 tuần nuôi cấy như sau:

Bảng 21. Kết quả tái sinh chồi từ mảnh lá sau 5 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng mảnh lá tạo chồi	Phần trăm mảnh lá tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	0/30	0	++
1	0,5	0/21	0	++++
1	1	1/27	4	+++
5	0,1	17/29	60	+++
5	0,5	7/29	24	++++
5	1	10/30	30	+++
10	0,1	27/30	90	+++
10	0,5	18/28	64	+++
10	1	22/29	76	++++

Qua bảng trên, chúng tôi nhận thấy với nồng độ BA thấp (1mg/l) các mảnh lá gần như không thể tái sinh được chồi con, khi nồng độ BA cao hơn (5mg/l) thì khả năng tái sinh cao hơn khoảng 60 % khi kết hợp với NAA thấp (0,1mg/l) và tỉ lệ mẫu lá tái sinh cao nhất (90%) khi nồng độ BA cao (10mg/l) và nồng độ NAA thấp (0,1mg/l). Kết quả cho thấy, mảnh lá có khả năng tái sinh cao trong môi trường có các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ thích hợp, điều này sẽ tạo thuận lợi cho quá trình chuyển gen sau này.

c) Tái sinh chồi từ cuống lá

Chúng tôi chỉ sử dụng các mẫu cuống lá với kích thước khoảng 5 - 10mm được đặt trên môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả tái sinh như sau:

Bảng 22. Kết quả tái sinh chồi từ cuống lá sau 5 tuần nuôi cấy:

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng cuống tạo chồi	Phần trăm cuống tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	0/30	0	++
1	0,5	0/35	0	+++
1	1	0/29	0	++++
5	0,1	14/24	60	+++
5	0,5	2/28	7	++++
5	1	2/30	6	++++
10	0,1	23/28	82	+++
10	0,5	29/36	80	+++
10	1	8/30	26	++++

Từ bảng trên chúng tôi nhận thấy với nồng độ BA thấp (1mg/l) các cuống lá chỉ hình thành mô sẹo mà không tái sinh được chồi con. Nồng độ BA cao hơn (5mg/l) sẽ cho tỉ lệ tái sinh cao hơn (60%) và khả năng tái sinh cao nhất khi nồng độ BA cao (10mg/l) và nồng độ NAA thấp (0,1- 0,5). Lượng NAA càng cao càng tăng hình thành mô sẹo đồng thời ức chế sự hình thành chồi từ cuống lá. Ở tất cả

các nghiệm thức mô cuống đều hình thành mô sẹo và các chồi con đều tái sinh thông qua mô sẹo.

d) Tái sinh chồi từ thân cây

Các mẫu thân với kích thước khoảng 2 - 5mm được đặt trên môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả tái sinh như sau:

Bảng 23. Kết quả tái sinh chồi từ thân cây sau 5 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng tạo chồi từ thân cây	% thân cây tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	28/32	80	+++
1	0,5	28/36	55	++++
1	1	7/27	30	++++
5	0,1	30/36	83	+++
5	0,5	33/39	84	+++
5	1	12/27	44	++++
10	0,1	28/30	94	++++
10	0,5	20/30	66	+++
10	1	16/31	52	+++

Khác với các mẫu lá và cuống, trong thí nghiệm này ở tất cả các nghiệm thức nuôi cấy thân đều tái sinh chồi con cho thấy mô thân cây Hồng là mô tế bào có khả năng tái sinh cao ngay cả khi nồng độ BA thấp (1 mg/l) và khả năng tái sinh thấp khi lượng NAA càng cao. Môi trường thích hợp nhất cho sự tái sinh từ thân cây là môi trường MS với 10mg/l BA và 0,1mg/l NAA và được khuyến cáo sử dụng trong quá trình chọn lọc tạo cây chuyển gen.

e) Kết quả tái sinh từ phương pháp cắt lớp mỏng tế bào

Các lát cắt ngang chồi hoặc rễ được tái sinh từ lớp biểu bì và dưới biểu bì rồi phát triển vào trung tâm. Ở lát cắt dọc, việc phát sinh hình thái chỉ xảy ra ở một đầu của mẫu cắt (ở đốt thân: đầu hướng xuống gốc; ở đốt cuống lá: đầu hướng về phía chồi nách). Các vị trí cắt trên cây là đốt thân (không sử dụng đốt thân thứ 4 trở xuống gốc), đốt cuống lá, mảnh lá. Lát cắt ngang và lát cắt dọc qua các vị trí trên, được đặt vào các môi trường có chất sinh trưởng là BA, NAA, IBA sau 10 và 14 ngày cho các số liệu sau: ở môi trường MS có BA 2mg/l mẫu cấy sau 10 ngày đã hình thành 100% chồi và mô sẹo xanh đậm.

3.3.2.3. Kết quả đánh giá chất chọn lọc phosphinothricin (PPT)

a) Ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT (phosphinothricin) đến mẫu lá và cây hồng *in vitro* và cây tại vườn ươm

Để khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đến mẫu lá, cuống, thân và cây Paulownia nhằm tìm những nồng độ chất chọn lọc thích hợp, chúng tôi tiến hành

thử nghiệm đặt các mẫu của cây đối chứng không chuyển gen vào môi trường thích hợp cho việc tái sinh cùng với chất chọn lọc với các nồng độ 2,4,6,8 mg/l PPT

b) Ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đến mẫu lá, cuống, thân

Mẫu lá ở nồng độ 2mg/l: khoảng 30% vẫn còn màu xanh nhưng không hình thành mô sẹo cũng như dấu hiệu của sự tái sinh chồi. Từ nồng độ 4mg/l trở lên toàn bộ mẫu đều vàng và hoàn toàn không phát triển, do đó chúng ta có thể sử dụng nồng độ 4mg/l cho việc chọn lọc tái sinh tạo cây chuyển gen.

Mẫu cuống và thân từ nồng độ 2mg/l trở lên: toàn bộ mẫu đều vàng và hoàn toàn không phát triển, do đó chúng ta có thể sử dụng nồng độ 2mg/l cho việc chọn lọc tái sinh tạo cây chuyển gen.

c) Ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đến cây đối chứng

Các cây đối chứng không chuyển gen được đặt vào môi trường MS với chất chọn lọc ở các nồng độ 2,4,6,8mg/l PPT. Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường chọn lọc cho thấy nồng độ 4mg/l đủ gây chết cây.

3.3.3. Hoàn thiện quy trình chuyển gen vào cây hồng

3.3.3.1. Nguyên liệu và phương pháp

a) Nguyên liệu

- *Chủng vi khuẩn và plasmit*

Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 chứa plasmit ITB mang gen *cryIA(c)* (gen kháng sâu), gen *bar* (gen kháng thuốc trừ cỏ Basta) và gen *gusA* (gen chỉ thị).

Gen kháng PPT (bar): có nguồn gốc từ loài nấm *Streptomyces hygroscopicus*. Gen này mã hóa cho enzym phosphinothricin acetyl transferase (PAT), giúp biến đổi PPT từ dạng ức chế sinh tổng hợp glutamine gây chết cây trồng sang dạng bị acetyl hóa không còn gây độc cho cây.

Gen cryIA(c): mã hóa cho một loại độc tố delta-endotoxin có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Loại protein này theo thức ăn xâm nhập vào cơ thể côn trùng làm sâu ngừng ăn và chết.

Môi trường giữ giống là LB có kháng sinh Kanamycin 50 mg/l. Để nhân giống phục vụ nghiên cứu chuyển gen, vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường AB (Chilton và CS,1974).

- *Thực vật*

Sử dụng giống cây hồng (*Paulownia fortunei*). Lá cây trong bình nuôi cấy kích thước khoảng 1 - 2cm² được dùng làm nguyên liệu chuyển gen.

b) Phương pháp chuyển gen

Sử dụng vi khuẩn đã nuôi cấy qua đêm để gây nhiễm mảnh lá, sau đó các mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường tái sinh tạo chồi (môi trường MS có 0,1 mg/l NAA và 10mg/l BA) có bổ sung chất acetosyringone nồng độ 100µM. Sau đó rửa và diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bằng dung dịch kháng sinh Cefotaxim 500 mg/l trong thời gian 30 phút, chuyển các mảnh lá sang môi trường tái sinh tạo chồi có chứa chất chọn lọc là Phosphinothricin (PPT) và Cefotaxim 500mg/l. Cấy truyền 2 tuần/lần trên cùng loại môi trường. Sau 6 tuần, mẫu lá có chồi tái sinh được cấy truyền sang môi trường ra rễ có chứa PPT. Một số cây ra rễ tốt được đưa ra trồng ở vườn ươm.

3.3.3.2. Kết quả chuyển gen ở cây hồng

a) Ảnh hưởng của PPT đến mảnh lá và khả năng tái sinh chồi

Trước khi tiến hành chuyển gen, chúng tôi khảo nghiệm ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đối với các mảnh lá đối chứng bằng cách đặt chúng vào môi trường tái sinh với các nồng độ 0, 2, 4, 6 và 8mg/l PPT. Theo dõi sau 4 tuần chúng tôi nhận thấy ở nồng độ 0 mg/l PPT các mảnh lá đã tạo mô sẹo và bắt đầu tái sinh tạo các chồi con, ở nồng độ 2mg/l còn một số mảnh lá còn duy trì được màu xanh nhưng không tạo được mô sẹo cũng như tái sinh. Riêng từ nồng độ 4mg/l PPT trở lên các mẫu lá đều bị vàng 100% và không còn khả năng phát triển, do đó chúng tôi sử dụng nồng độ 4mg/l PPT để chọn lọc mẫu lá sau khi xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Mẫu lá sau khi xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được đặt trên môi trường có PPT nồng độ 4mg/l, đa số các mảnh lá bắt đầu vàng sau 2 tuần nuôi cấy, một số mảnh lá vẫn duy trì màu xanh nhưng không hình thành mô sẹo, chỉ một số ít khoảng 10% hình thành mô sẹo và một số trong đó bắt đầu tái sinh sau 5 tuần nuôi cấy. Sau giai đoạn chọn lọc này, các chồi con được chuyển sang môi trường MS để ra rễ với 4mg/l PPT. Chỉ có vài dòng cây tiếp tục phát triển và ra rễ, được chúng tôi giả định là cây chuyển gen. Kết quả quá trình chuyển gen được thể hiện như sau:

Bảng 24. Tỷ lệ tái sinh chồi và cây chuyển gen của các mảnh lá trên môi trường có 4mg/l PPT sau khi nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* và mẫu lá đối chứng

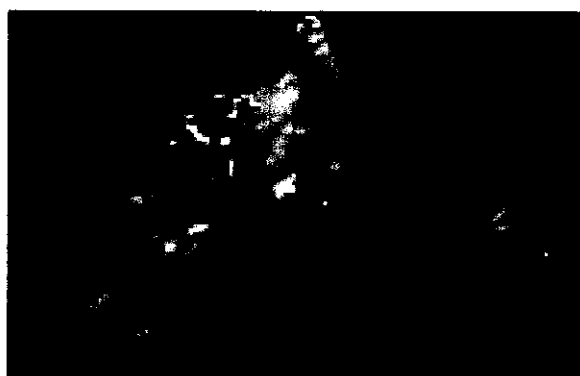
Thí nghiệm	Số mẫu lá	Số mẫu lá tạo mô sẹo	Số mẫu lá tái sinh chồi	Số lượng dòng cây chuyển gen	Tần số chuyển gen (%)
Chuyển gen	580	52	21	5	0,8
Đối chứng	30	0	0	0	0

Để khẳng định đây là những cây hông chuyển gen, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT với các nồng độ 0, 2, 4, 6 mg/l đến cây hông đối chứng. Chỉ sau 2 tuần, toàn bộ các cây đối chứng từ nồng độ 2mg/l PPT trở lên đều bị vàng lá và chết nhanh chóng, Do đó, chúng tôi cấy cây hông giả định chuyển gen và cây đối chứng vào môi trường ra rễ với chất chọn lọc PPT nồng độ 4mg/l để thử khả năng chống chịu, sau 2 tuần toàn bộ cây đối chứng chết, trong khi các cây giả định chuyển gen vẫn tiếp tục phát triển và ra rễ, giúp khẳng định đây là những cây hông đã được chuyển gen.

b) Kết quả phân tích cây hông chuyển gen

- Kiểm tra cây chuyển gen thông qua gen *gus*

Kiểm tra gen chỉ thị *gusA* bằng dung dịch *X-Gluc*: bằng cách ngâm các mảnh lá và chồi nhỏ với dung dịch *X-Gluc* khoảng 15 giờ ở 37°C, mẫu chuyển gen sẽ có màu xanh chàm đặc trưng, còn mẫu đối chứng sẽ không chuyển màu.



Hình 38. Biểu hiện của gen GUS trong lá cây hông chuyển gen

Các chồi nhỏ và mảnh lá của cây chuyển gen đã được xử lý với dung dịch *X-Gluc*, kết quả cho thấy chồi và mảnh lá này có màu xanh chàm đặc trưng khẳng định sự biểu hiện của gen *gusA* trong cây chuyển gen.

- Sự biểu hiện của gen *bar* trong cây chuyển gen



Hình 39. Cây Hồng tái sinh



Hình 40. Cây Hồng chuyển gen phát triển, cây đối chứng chết trong môi trường chọn lọc PPT

- Kiểm tra qua tính kháng basta ở vườn ươm

Các cây chuyển gen và đối chứng được phun thuốc trừ cỏ Basta tại vườn ươm để kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *bar* trong cây chuyển gen.

Gen *bar* tạo tính trạng kháng thuốc trừ cỏ đã được khẳng định trong cây in vitro, tuy nhiên chúng tôi muốn tiếp tục khảo sát sự duy trì và khả năng biểu hiện ổn định của gen này trên cây sau khi được trồng ra môi trường tự nhiên ngoài vườn ươm. Trước hết phải khảo sát ngưỡng gây chết 100% đối với cây đối chứng tại vườn ươm. Cây hồng đối chứng trồng tại vườn ươm khoảng 1 tháng tuổi được phun thuốc trừ cỏ Basta với các nồng độ là 100, 150, 200 và 300mg/l PPT, sau 2 tuần các cây được phun ở nồng độ 200 và 300mg/l PPT hoàn toàn chết còn các cây ở nồng độ 100 và 150mg/l PPT chỉ ở đỉnh cây bị vàng nâu và sau 4 tuần thì các cây này hồi phục tạo chồi từ các nhánh dưới. Do đó, chúng tôi sử dụng nồng độ 200 và 300mg/l PPT để phun lên các cây chuyển gen 1 tháng tuổi tại

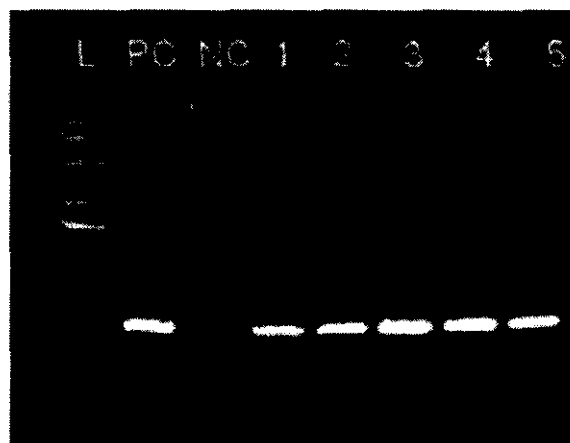
vườn ươm. Sau 2 tuần nhận thấy các cây hồng chuyển gen tiếp tục sinh trưởng và phát triển bình thường, chỉ có một dòng cây hơi bị vàng lá phía dưới nhưng vẫn sống và phát triển cho phép chúng tôi khẳng định một lần nữa đây là những cây hồng đã nhận được gen chuyển.

- Kiểm tra bằng PCR đối với gen *cryIA(c)*

Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* được kiểm tra qua phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt với trình tự ADN của mồi như sau:

mồi 1: ACAGAAGACCCTTCAATATC và

mồi 2: GTTACCGAGTGAAGATGTAA.



Hình 41. Kết quả PCR của gen *cryIA(c)*

L: Thang chuẩn DNA 1kb; PC: Đối chứng dương tính; NC: Đối chứng âm tính: cây không chuyển gen; 1-5: các mẫu cây chuyển gen

Kích thước đoạn ADN của gen *cryIA(c)* ở cây chuyển gen và đối chứng dương tính (plasmid) được khuếch đại là 0,65Kb. Qui trình tách ADN thực vật được tiến hành theo phương pháp của Dellaporta (1983).

Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* bằng kỹ thuật PCR và khả năng kháng sâu của cây chuyển gen:

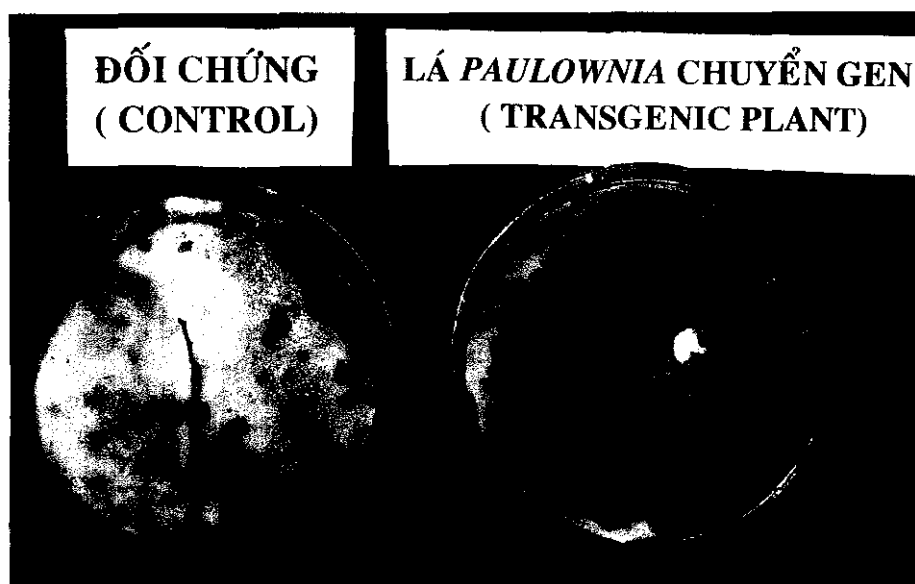
Kết quả phân tích PCR với cặp mồi chuyên biệt đối với gen *cryIA(c)* cho thấy các mẫu ADN của cây chuyển gen sau khi chạy điện di có xuất hiện các băng có kích thước 0,65Kb giống như mẫu đối chứng dương tính (plasmid), chúng là kết quả của sự khuếch đại gen *cryIA(c)* trong khi mẫu cây đối chứng hoàn toàn không có băng. Qua đó, chúng tôi khẳng định sự hiện diện của gen *cryIA(c)* trong nhiễm sắc thể của cây hồng chuyển gen.

- Kiểm tra tính kháng sâu ở vườn ươm

Các cây chuyển gen và đối chứng được kiểm tra sự biểu hiện của gen *cryIA(c)*

qua khả năng kháng sâu bằng cách thả sâu xanh *Heliothis armigera* lên các mẫu lá nhỏ của cây trồng tại vườn ươm.

Các cây hồng chuyển gen được chuyển ra trồng trong vườn ươm. Để thử nghiệm tính kháng sâu, các lá nhỏ được đặt trong đĩa petri cùng sâu xanh *Heliothis armigera*. Sau 3 ngày, với các lá đối chứng, diện tích lá bị hại lớn, kích thước sâu tăng rõ rệt, trong khi đó ở lá cây chuyển gen diện tích lá bị sâu ăn nhỏ, sâu tăng trưởng rất kém và sau 3 ngày sâu hoàn toàn không còn ăn và chết nhiều vào ngày thứ 5 hoặc 6.



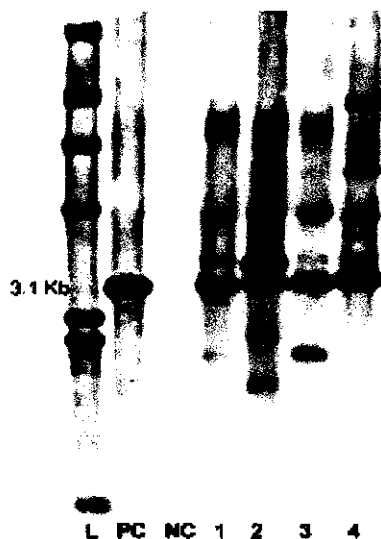
Hình 42. Kết quả thử tính kháng sâu của các dòng hồng chuyển gen so với đối chứng không chuyển gen

- Kiểm tra qua lai phân tử Southern và lai miễn dịch Western

Các cây chuyển gen và đối chứng được kiểm tra bằng kỹ thuật Southern và Western blot (Phụ lục 1) để khẳng định sự hiện diện và biểu hiện của gen *cryIA(c)*.

- Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* bằng kỹ thuật Southern Blot

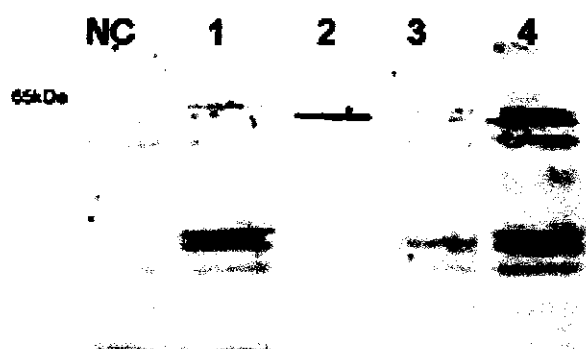
Nhiễm sắc thể của cây Hồng chuyển gen và đối chứng được tách chiết dựa vào phương pháp sử dụng CTAB. Sau đó ADN của nhiễm sắc thể được cắt bởi enzym giới hạn là *Hind* III và sử dụng bộ Kit AlkPhos Direct Labelling and Detection Systems của công ty Amersham Pharmacia Biotech (không đồng vị phóng xạ) để tiến hành kỹ thuật Southern blot. Thang chuẩn là λ DNA cắt bởi *Hind* III. Đoạn ADN 3,1kb gồm promoter, gen *cryIA(c)* và đoạn kết thúc được sử dụng làm đối chứng dương tính. Kết quả phân tích Southern blot (Hình 43) với các vết (band) đã khẳng định sự hiện diện và đồng nhất gen *cryIA(c)* trong cây hồng chuyển gen.



Hình 43. Kết quả phân tích Southern blot của cây Hồng

- Sự biểu hiện của gen *cryIA(c)* bằng kỹ thuật Western Blot

Sản phẩm protein *cryIA(c)* trong các cây hồng chuyển gen được kiểm tra bằng phản ứng miễn dịch dùng kháng thể gen *cryIA*. Trên màng nitrocellulose xuất hiện vạch đối với tất cả cây chuyển gen, trong khi đó tại vị trí này (khoảng 65kDa) không có phản ứng tương tác giữa kháng thể với protein của cây đối chứng. Chứng tỏ gen *cryIA(c)* hoạt động tốt, hình thành được độc tố *Bt* trong cây chuyển gen phù hợp với kết quả thử sâu trên cây hồng chuyển gen tại vườn ương.



Hình 44. Kết quả Western blot của của cây Hồng



Hình 45. Cây Paulownia chuyển gen

c) Kết luận về chuyển gen cây hồng

Với việc sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 mang plasmit ITB để chuyển gen, chúng tôi đã nhận được một số dòng cây Hồng chuyển gen mang gen *cryIA(c)* kháng sâu xanh *Heliothis armigera*. Bằng các kỹ thuật sinh học và sinh học phân tử chúng tôi đã xác định được các gen này hiện diện trong cây Hồng chuyển gen và các gen chuyển đã hoạt động và biểu hiện tính trạng rất rõ rệt.

3.4. CHUYỂN GEN ANTI - ACO GIỮ HOA LÂU TÀN VÀ GENE *cryIA(c)* KHÁNG SÂU VÀO CÂY HOA CÚC

3.4. Chuyển gen Anti - ACO giữ hoa lâu tàn và gene *cryIA(c)* kháng sâu vào cây Hoa cúc

3.4.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây hoa cúc

3.4.2. Vật liệu và phương pháp

3.4.2.1. Vật liệu

3.4.2.2. Phương pháp nghiên cứu

3.4.3. Kết quả chuyển gen ở cây hoa cúc

3.4.3.1. Hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô hoa cúc

3.4.3.2. Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.4. Kết luận và hướng nghiên cứu tới

3.4.4.1. Kết luận

3.4.4.2. Kế hoạch nghiên cứu trong những năm tới

3.4.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây hoa cúc

Nhờ thành tựu của ngành Công nghệ Sinh học nói chung và Công nghệ gen nói riêng nên trong hơn 1 thập kỉ qua nhiều gen quý đã được chuyển vào một số loại cây trồng nhằm tạo ra cây trồng mang các gen có những đặc tính mong muốn. Chỉ trong vòng 15 năm phát triển các nhà khoa học trên thế giới đã tạo ra hơn 60 loài cây trồng mang những gen ngoại lai đặc trưng có các đặc tính quan trọng như: kháng sâu bệnh, kháng thuốc diệt cỏ, kháng thuốc trừ sâu *Bt*, chịu lạnh.

1. Ở Việt Nam, một số Viện nghiên cứu như: Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long... đã có những thành tựu về công nghệ gen đáng ghi nhận, tạo ra các cây trồng chuyển gen như: lúa mang gen kháng bệnh bạc lá (Phan Tố Phương và CS), các cây họ cải mang gen kháng sâu và kháng chất diệt cỏ (Đặng Trọng Lương và CS)... Bên cạnh một số cây lương thực và cây rau được biến đổi gen, việc nghiên cứu chuyển gen vào đối tượng cây hoa nhằm kéo dài tuổi thọ của hoa cắt cũng được quan tâm.

Để giải quyết vấn đề này, hiện nay, một hướng nghiên cứu là tạo ra các giống cây ăn quả mang gen chín chậm nhờ phương pháp chuyển gen đang được tiến hành ở nhiều nơi trên thế giới. Trên thực tế, người ta chủ yếu sử dụng gen ACC oxidase (ACO) để ức chế quá trình chín quả, đặc biệt đối với các loại quả có thời gian bảo quản ngắn, khó vận chuyển như: cà chua, dưa đỏ, dâu tây, nho, đu đủ,... Ngoài ra, gen ACO cũng được ứng dụng để kéo dài thời gian tồn tại của hoa, lá, quả trên cây, ngăn cản sự già hóa...

Tất cả những cơ thể chuyển gen mang gen antisense ACC oxidase hoặc ACC synthase đều được xác định là có sự giảm đáng kể quá trình sinh tổng hợp ethylene và có những biến đổi trong quá trình chín quả: ở dưa đỏ hàm lượng ethylene nội sinh giảm đi 1% so với đối chứng không chuyển gen antisense ACO; ở cây đào, antisense ACO được chuyển vào để ngăn quá trình làm mềm quả; cây hoa cẩm chướng chuyển gen có sự giảm mức độ ethylene và chậm lại sự hóa già của tràng hoa so với cây không được chuyển gen...; ở cà chua chuyển gen chín chậm, nhờ antisense quá trình mềm quả, thay đổi màu sắc ... đều chậm hơn đối chứng rất nhiều.

Do vậy, nội dung nghiên cứu của đề tài này nhằm giải quyết:

Chuyển gen anti - ACO vào giống hoa cúc vàng nhằm kéo dài tuổi thọ hoa cắt của cây hoa này.

2. Chuyển gen *Bt* (*cryIA(c)*) vào giống hoa cúc vàng nhằm tăng tính kháng sâu của cây hoa này.

3.4.2. Vật liệu và phương pháp

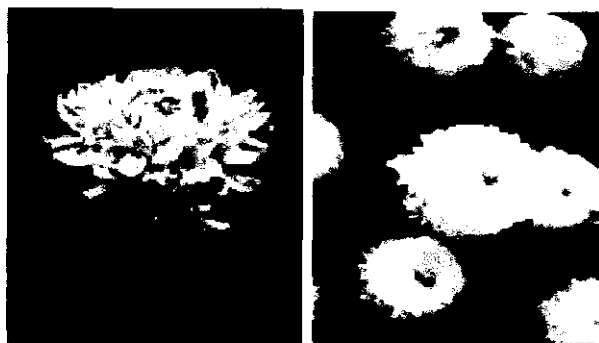
3.4.2.1. Vật liệu

Các giống hoa cúc HCV1 và HCT1, được cung cấp bởi Trung tâm Hoa cây cảnh Viện Di truyền Nông nghiệp, đang được ưa thích trên thị trường (Hình 45).

Các mẫu cúc được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashie - Skoog, 1962) có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng và các thành phần cần thiết khác.

Các plasmit dùng cho biến nạp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* bao gồm:

- Plasmit pAnti - ACO 2300 được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học Việt Nam (Hình 46).
- Plasmit pART 27 mang gen *Bt* (*cryIAc*) kháng sâu được cung cấp bởi phòng Sinh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp (Hình 46).

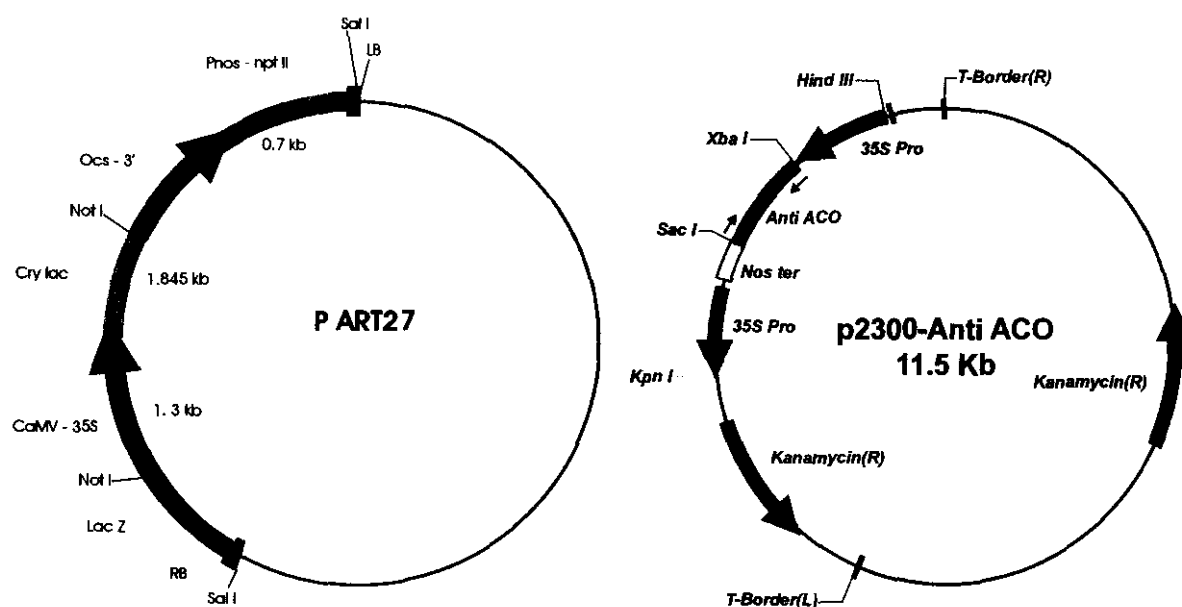


Hình 46. Giống cúc thí nghiệm: HCV1 và HCT1

3.4.2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Chuẩn bị mẫu và tiền nuôi cấy trước khi biến nạp

Lá non in vitro được cắt nhỏ thành kích thước 0,8 x 0,8cm. Mẫu lá được đặt trên môi trường (B3, MS đặc bổ sung 1,5mg/l BAP và 0,5mg/l NAA cho giống HCT1; R6, MS đặc bổ sung 2,0mg/l BAP và 1,0 mg/l NAA cho giống HCV1) không có kháng sinh. Nuôi 2 - 3 ngày trong điều kiện nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 16h/ ngày, dùng làm nguyên liệu cho biến nạp.



Hình 47. Cấu trúc plasmit pART 27 mang gen Bt (*CryIAc*)

* Phương pháp biến nạp

- Nuôi cấy vi khuẩn.
- Vi khuẩn *Agrobacterium* được nuôi cấy theo phương pháp của Nancy L.Mathis và Maud A. Whinchee (Mỹ).
- Ly tâm dịch nuôi để thu lấy tế bào vi khuẩn.
- Lây nhiễm và đồng nuôi cấy.
- Thời gian lây nhiễm: 30'; thời gian đồng nuôi cấy: 2 ngày trong tối ở 28°C.
- Chọn lọc và tái sinh: Sử dụng kháng sinh chọn lọc thích hợp.

* Kiểm tra sự có mặt của các gen ngoại lai có trong cây

Kiểm tra sự biểu hiện của gen *nptII*: Sử dụng nồng độ chọn lọc 50mg/l Kanamycin.

Kiểm tra sự có mặt của promoter 35S trong hệ gen của cây cúc chuyển gen

bằng phương pháp PCR: sử dụng cặp mồi 35S cho đoạn *promoter* này. Sự xuất hiện của băng có kích thước của đoạn này khẳng định sự có mặt của gen ngoại lai trong hệ gen của vật chủ.

Kiểm tra sự có mặt của gen Anti - ACO bằng kỹ thuật lai Southern.

3.4.3. Kết quả chuyển gen ở cây hoa cúc

3.4.3.1. Hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô hoa cúc

Để chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* có thể sử dụng tất cả các bộ phận của cây: mẫu rễ và thân..., tuy nhiên, đối với cây hoa cúc thì lá là một nguồn tế bào tái sinh thích hợp để chuyển gen quan tâm.

Để thăm dò khả năng tái sinh của mẫu lá, chúng tôi đã sử dụng môi trường MS có các tổ hợp phytohormon khác nhau, với các giống cúc HCV1, HCT1, HCT2, HCD1.

Bảng 25. Ảnh hưởng của các tổ hợp (NAA và BAP) đến tỷ lệ tái sinh từ mẫu lá giống HCT1

BAP(mg/l) NAA(mg/l)	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
0,5	-	-	92%	55%	-
1,0	-	-	27%	47%	-
1,5	-	-	-	68%	-
2,0	-	-	-	-	-

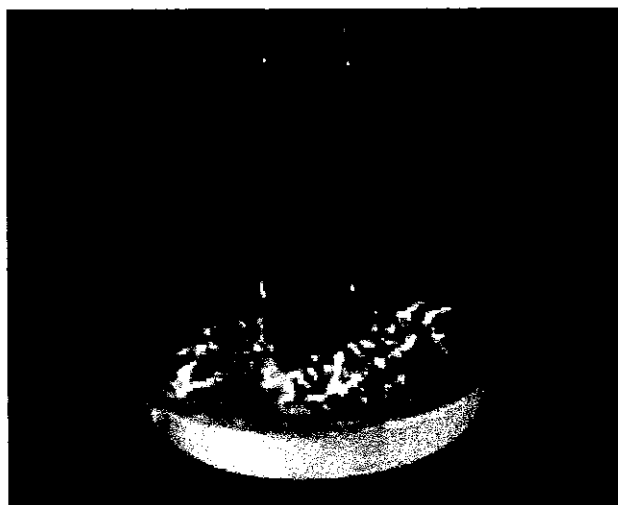
Bảng 26. Ảnh hưởng của các tổ hợp (NAA và BAP) đến tỷ lệ tái sinh từ mẫu lá hoa cúc giống HCV1

BAP(mg/l) NAA(mg/l)	1,0	2,0	3,0
0,5	-	-	-
1,0	-	94%	-
1,5	-	24%	48%
2,0	-	-	64%

Theo bảng 25 và 26 ta thấy tỷ lệ tái sinh cao nhất đạt 92% của giống HCT1 là ở môi trường có bổ sung 1,5mg/l BAP và 0,5mg/l NAA, trong khi ở giống HCV1 đạt 92% là môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP và 1mg/l NAA.

Chồi được cấy lên môi trường MS có chứa NAA 0,1 mg/l để tạo rễ, rễ bắt đầu xuất hiện sau 7 ngày. Qua quan sát cho thấy, sau 2 tuần độ dài rễ đạt 3,5 - 4,5cm, rễ trắng khỏe, số rễ trung bình/cây đạt từ 5 - 7 rễ. Chúng tôi nhận thấy đây là môi trường thích hợp để ra rễ giống cúc này.

Cây hoàn chỉnh được đưa ra cát với tỷ lệ sống là 95 - 99%. Sau khi bộ rễ đã hoàn thiện, cây được trồng ra đất với tỷ lệ sống là 95%.



Hình 48. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá giống HCV1



Hình 49. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá giống HCT1

3.4.3.2. Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

* Ảnh hưởng của tiên nuôi cấy (TNC) đến tỷ lệ sống của mẫu sau lây nhiễm

Những mẫu lá non có kích thước khoảng 0,8 x 0,8cm được cấy lên môi trường tái sinh R3 với thời gian khác nhau (từ 1 - 3 ngày), thời gian tiên nuôi cấy được giới hạn 1 - 3 ngày vì trong giai đoạn này tế bào phân chia mạnh tạo ra sinh khối lớn và chưa biệt hoá, thuận lợi cho việc chuyển gen.

Chúng tôi nhận thấy thời gian tiên nuôi cấy càng dài thì mẫu càng khỏe hơn: bản lá to, dày và xốp hơn. Với mẫu tiên nuôi cấy 1 - 2 ngày, khi tiến hành gây vết thương mới và lây nhiễm, tỷ lệ chết vẫn cao (21 - 42%, giống HCT1; 23 - 45% đối với giống HCV1), tỷ lệ chết đen mặt cắt lên đến 25 - 35% tuy có giảm hơn so với đối chứng (28 - 61%). Kết quả tốt nhất mà chúng tôi thu được là thí nghiệm có xử lý TNC 3 ngày trước khi lây nhiễm với tỷ lệ chết giảm còn 10% và tỷ lệ chết đen tế bào mặt cắt chỉ còn 7%.

Bảng 27. Ảnh hưởng của tiền nuôi cấy lên sức sống của mẫu sau lây nhiễm giống HCT1

(Tiến hành thí nghiệm 100 mẫu đối với 1 công thức)

Công thức	Số ngày xử lý TNC	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ chết đen mặt cắt (%)	Tỷ lệ tái sinh từ mặt cắt (%)
1	1 ngày	42	35	23
2	2 ngày	21	25	51
3	3 ngày	10	7	81
4	Đối chứng	61	28	90

Bảng 28. Ảnh hưởng của tiền nuôi cấy đối với sức sống của mẫu sau lây nhiễm giống HCV1

(Tiến hành thí nghiệm 100 mẫu đối với 1 công thức)

Công thức	Số ngày xử lý TNC	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ chết đen mặt cắt (%)	Tỷ lệ tái sinh từ mặt cắt (%)
1	1 ngày	45	34	21
2	2 ngày	23	25	52
3	3 ngày	11	5	84
4	Đối chứng	62	29	9



Hình 50. Các mẫu lá cây hoa cúc biến nạp

A: Mẫu xử lý tiền nuôi cấy B: Mẫu không xử lý tiền nuôi cấy

Sau khi xử lý TNC, tiến hành gây vết thương mới và lây nhiễm với vi khuẩn. Quá trình đồng nuôi cấy kéo dài 48h với sự có mặt của Acetosiringone 50mM như là một chất dẫn dụ sinh học. Chất này đóng vai trò là chất cảm ứng cho các gen *Vir* hoạt động. Quá trình này diễn ra trong điều kiện pH thấp và được tăng cường nhờ các opine và monosaccharide. Kết quả của quá trình này là một mạch đơn của T-ADN được cắt ra tại hai đầu trình tự viên và chuyển từ vi khuẩn sang tế bào thực vật với đầu 5' đi trước. Sau khi đã qua màng tế bào, đoạn mạch T đi vào nhân và kết hợp với ADN trong nhân ở vị trí ngẫu nhiên.

*** Kết quả chọn lọc và tạo cây hoàn chỉnh**

Chọn lọc: Chủng vi khuẩn *Agrobacterium* LBA 4404 AA3 có mang vectơ là plasmit pART 27 có chứa gen *nptII* (Neomycin phosphotransferase II) và gen *CryIA(c)* (kháng sâu) thay thế một phần của T-ADN. Còn chủng vi khuẩn *Agrobacterium* LBA 4404 AA3 có mang vector là plasmit pAnti - ACO 2300 có chứa gen *nptII* (Neomycin phosphotransferase II) và gen *Anti -ACO* (giữ hoa lâu tàn) thay thế một phần của T-ADN. Vì vậy, chúng có thể được chuyển vào tế bào lá hoa cúc trong quá trình biến nạp. Gen *nptII* và gen *CryIAC*, *Anti -ACO* cùng được điều khiển bởi promotor CAMV 35S. Promotor này hoạt động tốt trong bộ gen thực vật. Do vậy, ở những cây được biến nạp nếu biểu hiện kiểu hình, những gen này sẽ cho các tính trạng: một là kháng Kanamycin trong môi trường chọn lọc, hai là gen *CryIA(c)* tạo ra protein Bt có khả năng kháng lại một số sâu hại và gen *anti - ACO* giữ cho hoa tươi lâu hơn.

Kháng sinh Kanamycin với nồng độ 50mg/l được sử dụng làm yếu tố chọn lọc.



Hình 51. Chồi biến nạp HCT1 trên môi trường chọn lọc (sau 4 tuần)



Hình 52. Chọn lọc cây hoa cúc chuyển gen *cryIA(c)*
Bên trái: Mẫu đối chứng; Bên phải : Mẫu chuyển gen



Hình 53. Chồi biến nạp trong môi trường ra rễ

Quá trình chọn lọc được tiến hành đối với những cụm chồi 18 ngày tuổi.

Kháng sinh Kanamycin ức chế quá trình sinh tổng hợp protein ở thực vật cho nên sau 14 ngày đã xuất hiện nhiều chồi có biểu hiện bạch tạng. Sau 35 ngày ở lô đối chứng, tỷ lệ bạch tạng thu được là 100%. Nhiều chồi biến nạp biểu hiện rõ tính kháng kháng sinh, chồi phát triển bình thường: thân lá xanh tốt (Hình 53). Tính kháng này có được là do tế bào có thể đã mang gen ngoại lai *nptII* được điều khiển bởi promotor CAMV35S. Khi promotor hoạt động, gen *nptII* sẽ mã hoá cho neomycin phosphotransferase (APH[3']-II) làm mất hoạt tính của kháng sinh nên cây vẫn phát triển được. Tuy nhiên, thực vật đôi khi cũng có thể tồn tại trên môi trường khắc nghiệt trong một khoảng thời gian nhất định nào đó. Cho nên để xác định chắc chắn những cây này có mang gen ngoại lai hay không, chúng tôi sử dụng phương pháp PCR để phân tích.

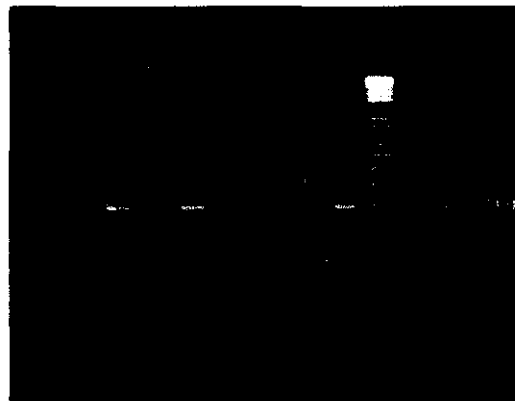
*** Kiểm tra sự có mặt của promotor 35S trong cây cúc được biến nạp**

Đoạn CAMV 35S là promotor điều khiển sự hoạt động của gen *cryIA(c)*, *anti-ACO* và gen *nptII*. Để xác định sự có mặt của đoạn promotor này, chúng tôi tiến hành làm phản ứng PCR với cặp mồi 35S1/35S2 để nhận một trình tự đặc trưng của nó. Nếu mẫu ADN của cây nào cho phản ứng dương tính (có băng) thì chúng tôi cho đoạn promotor 35S đã được chuyển thành công vào cây hoa cúc.



Hình 54. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR của giống HCT 1 với mồi của đoạn promotor 35S

1: Maker 1kb ladder; 2: Plasmid ART27 ; 23: Đối chứng âm; 24: H₂O; 5, - , 22 Mẫu thí nghiệm chuyển gen: Cây chuyển gen; 25: Marker



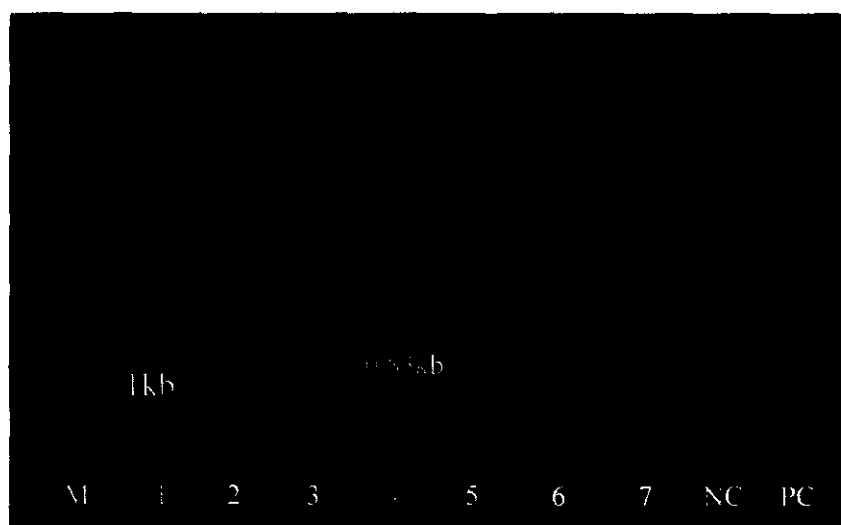
Hình 55. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu HCV1

1: Maker 1kb, 2: Plasmid ART27 ; 3: H₂O; 4 : Đối chứng; 5,6,8: Cây chuyển gen; 7: Cây không được chuyển gen

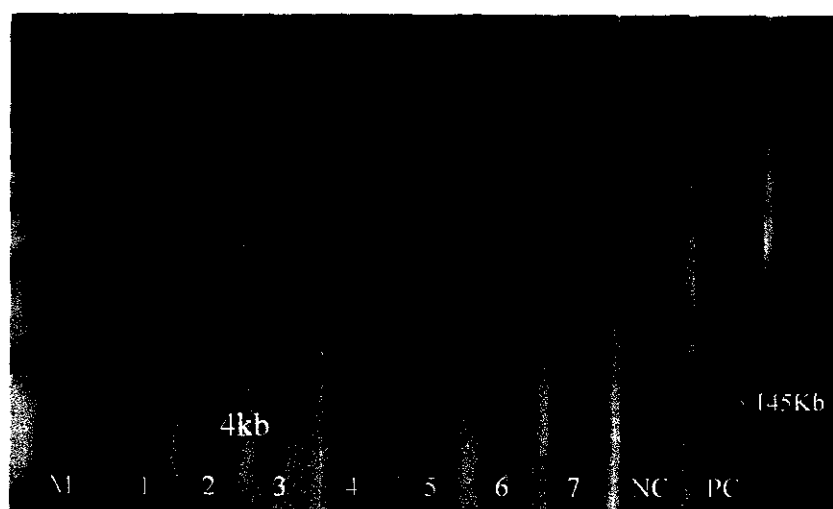
Sau khi thực hiện phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên gel Agarose và so sánh với marker 1kb, chúng tôi xác định được các băng dài rõ nét khoảng 195bp đối với 14 mẫu ADN của cây cúc đã biến nạp. Các mẫu đối chứng đều không lên băng (Hình 53). Còn với giống HCV1 (Hình 54) nhận thấy các mẫu 5, 6, 8 là mẫu chuyển gen khi so sánh với marker và các mẫu đối chứng.

*** Kiểm tra sự có mặt của gen trong cây cúc biến nạp bằng lai Southern**

Sự có mặt của các gen đã được biến nạp một lần nữa được khẳng định nhờ kết quả lai ADN. Những mẫu ADN tách ra từ các cây trồng biến nạp được xử lý bằng enzym giới hạn sau đó được chạy trên gel và được cố định lên màng lai nilon và được lai với các mẫu dò là các gen *anti* - ACO, gen *cryIA(c)* được tách ra từ vi khuẩn và được đánh dấu mẫu dò với các chất phát quang hoá học. Sự bắt cặp giữa mẫu dò và mẫu nghiên cứu sẽ cho kết quả trên phim và qua đó ta kết luận được sự có mặt của các mẫu đã được chuyển gen hay không.



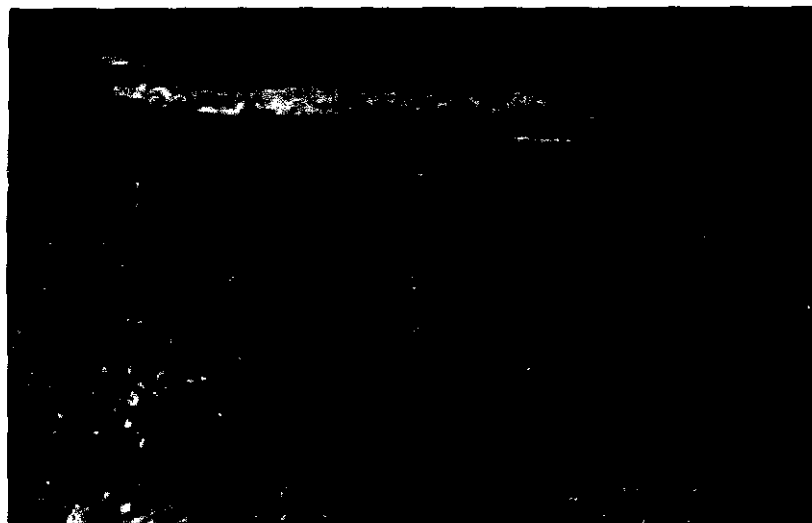
Hình 56. Kết quả lai ADN xác định gen *anti*-ACO trong cây hoa cúc chuyển gen; NC: negative control; PC: positive control; M: Marker; 1,2,7: Mẫu KT



Hình 57. Kết quả lai ADN xác định gen *cryIA(c)* trong cây hoa cúc chuyển gen; M: Marker; 1, 2, ..., 7, Mẫu KT; NC: negative control; PC: positive control

*** Trồng và đánh giá các dòng cúc chuyển gen trong điều kiện nhà lưới**

Những dòng cúc chuyển gen đang được lưu giữ và tiếp tục được nghiên cứu, đánh giá trong điều kiện nhà lưới về những tính trạng nghiên cứu.



Hình 58. Các dòng cúc chuyển gen trồng trong nhà lưới

3.4.4. Kết luận và hướng nghiên cứu tới

3.4.4.1. Kết luận

1. Đã hoàn thiện được qui trình tái sinh cây từ mẫu lá và bước đầu chuyển gen *anti* - ACO và gen *Bt cryIA(c)* vào hai giống hoa cúc HCV1 và HCT1.
2. Xác định có mặt gen ngoại lai *anti* - ACO và gen *Bt* trong các cây hoa cúc chuyển gen bằng PCR và lai phân tử ADN Southern blot.
3. Đã thu được 14 cây hoa cúc mang gen *anti* - ACO và 20 cây hoa cúc mang gen *Bt*.

3.4.4.2. Kế hoạch nghiên cứu trong những năm tới

1. Đánh giá khả năng tươi lâu các cây hoa cúc chuyển gen *anti* - ACO trong điều kiện hoa cắt.
2. Thử khả năng kháng sâu xanh và sâu xám hại đối với những cây hoa cúc chuyển gen *Bt*.
3. Phân tích protein các cây hoa cúc chuyển gen.
4. Đánh giá mức độ an toàn của cây hoa chuyển gen với sinh thái và môi trường.

3.5. KẾT QUẢ TẠO DÒNG LÚA KHÁNG BỆNH BẠC LÁ, RẦY VÀ KHÁNG SÂU BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN KHÁC NHAU

3.5. Kết quả tạo dòng lúa kháng bệnh bạc lá, rầy và kháng sâu bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau

3.5.1. Căn cứ khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây lúa

3.5.2. Hoàn thiện quy trình chuyển gen trên giống lúa nhóm indica và tạo dòng lúa biến đổi gen kháng rầy nâu

3.5.2.1. Nội dung

3.5.2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.5.2.3. Kết quả thực hiện chuyển gen

3.5.3. Chuyển gen *cryIA(b,c)* kháng sâu vào cây lúa thông qua *A. tumefaciens* -

3.5.3.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen kháng sâu đục thân vào cây lúa

3.5.3.2. Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân và kháng bệnh bạc lá thông qua *A. tumefaciens* và chọn lọc bằng Hyg

3.5.3.3. Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân qua trung gian *A. tumefaciens* và chọn lọc bằng mannose

3.5.1. Căn cứ khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen vào cây lúa

Công nghệ chuyển gen trên cây trồng hiện nay đang được thực hiện ở nhiều nước phát triển như: Mỹ, Anh, Nhật, Pháp trên nhiều loại cây khác nhau như: bắp, khoai tây, cà chua, bông vải, mía, chuối, lúa, lúa mì... với các loại gen khác nhau. Các nước đang phát triển chú trọng công nghệ này là Trung Quốc và Ấn Độ. Thành tựu của công nghệ chuyển gen trên cây lúa là chuyển được các gen hữu dụng vào cả hai nhóm lúa *indica* và *japonica*. Các gen này bao gồm: gen kháng sâu, bệnh, kháng thuốc trừ cỏ, mặn, hạn và gen làm tăng các vi dưỡng chất.

Để chuyển gen mong muốn vào cây trồng, thông thường người ta phải chuyển kèm theo một gen tạo tính kháng chất kháng sinh hoặc kháng chất trừ cỏ, sau đó dùng các chất này để chọn lọc xác định cây biến đổi gen vì chỉ có tế bào đã biến đổi gen mới sống được trong môi trường nuôi cấy mô có chứa các chất này. Việc cây trồng biến đổi gen mang theo gen tạo tính kháng chất kháng sinh hoặc kháng chất trừ cỏ gây ra nhiều lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen nếu như gen không mong muốn này bị chuyển vào một sinh vật khác. Nhằm khắc phục nhược điểm này, gần đây một phương pháp chọn lọc mới đã được đưa vào sử dụng, đó là dùng mannose (chất đường) để chọn lọc thay cho dùng chất kháng sinh hay chất trừ cỏ.

Hai phương pháp chuyển gen vào cây trồng thường được sử dụng là dùng súng bắn gen hoặc dùng vi khuẩn *A. tumefaciens* làm trung gian chuyển gen vào cây trồng.

Việc sử dụng *A. tumefaciens* để chuyển gen trên cây lúa thuộc nhóm một lá mầm (monocot) thường khó hơn trên cây hai lá mầm (dicot) vì lúa không phải là ký chủ của vi khuẩn này. Hiei và CS (1994) đã thành công đầu tiên khi sử dụng dòng *A. tumefaciens* LBA4404 mang plasmit pTOK233, có chứa các gen độc (*virB*, *virC*, *virG*), từ plasmit pTiBo (super virulent), trên các giống japonica, với hiệu quả chuyển 20,5%. Aldermita và Hodges (1996) đã thành công trong việc chuyển gen nhờ dòng vi khuẩn chứa plasmit đó trên các giống lúa *indica* với hiệu quả chuyển thấp hơn, 1 - 5%. Ye và CS (2000) đã chuyển gen thành công vào cây lúa (giống Taipei 309) 3 gen (*psy*, *crtI* và *lyC*) để tạo ra các enzyme giúp sinh tổng hợp beta-carotene. Tại Viện lúa ĐBSCL, các giống lúa đang trồng phổ biến được thử nghiệm khả năng tương hợp với chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA 4404.

Chuyển gen nhờ súng bắn gen là phương pháp hiệu quả nhất trong các phương pháp chuyển gen trực tiếp (điện thẩm, hóa thẩm, vi tiêm), và nó khắc phục được những khó khăn mà phương pháp *Agrobacterium* mắc phải (phổ ký chủ giới hạn, tỉ lệ tái sinh thấp...). Cao và CS (1992) chuyển thành công plasmit mang gen *bar* (kháng basta) vào dịch treo tế bào lúa. Sivamani và ctv (1996) xây dựng quy trình chuyển gen trên các giống *indica* (TN1). Zhang (1996) đã tạo được cây chuyển gen từ dịch treo tế bào lúa *indica*. Wunn và CS (1996) chuyển thành công plasmit CaMV 35S *CryIA(b)* mang gen *Bt* vào phôi giống IR58. Từ những kết quả mang tính khởi đầu này, hiện nay công nghệ chuyển gen có rất nhiều kết quả đột phá.

Xu hướng hiện nay ưa chuộng phương pháp dùng *Agrobacterium* hơn vì phương pháp dùng thiết bị bắn gen thường tạo ra cây biến đổi gen trong đó gen được chuyển vào với nhiều bản (copy) và gắn vào nhiều vị trí trên hệ gen, có sự sắp xếp lại chứ không nguyên bản. Vị trí thích hợp của gen chuyển có thể từ sự gắn một điểm đến cấu trúc phức tạp do sự gắn nhiều điểm và sự tái sắp xếp lại của gen chuyển. Gen chuyển được gắn vào một vị trí và nguyên vẹn tạo ra một sản phẩm gen nhưng gen chuyển gắn vào nhiều vị trí trên hệ gen và có sắp xếp lại tạo ra nhiều sản phẩm gen, trong đó có thể có những sản phẩm gen không mong đợi hoặc không có lợi. Nghiên cứu về cấu trúc vị trí của gen chuyển là rất cơ bản cho việc tiên đoán sự thể hiện của gen được chuyển và tính an toàn của cây biến đổi gen.

Sự phát triển hoàn thiện công nghệ chuyển gen vào cây trồng sẽ giúp công nghệ này được tiếp nhận thân thiện hơn trong tương lai không xa, tạo ra các sản phẩm có ích cho xã hội đã không có được bằng công nghệ tạo giống truyền thống.

Các kết quả nghiên cứu nhằm hai mục tiêu chính:

1. Tiêu chuẩn hóa phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*

và máy bắn gen trên các giống lúa nhóm *indica* trồng ở Việt Nam (KDML105, IR64) và tạo dòng lúa biến đổi gen kháng rầy nâu.

2. Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* và hệ thống chọn lọc bằng kháng sinh và chọn lọc bằng mannose.

3.5.2. Hoàn thiện quy trình chuyển gen trên giống lúa nhóm *indica* và tạo dòng lúa biến đổi gen kháng rầy nâu

3.5.2.1. Nội dung

Tiêu chuẩn hoá phương pháp chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* và súng bắn gen trên các giống lúa nhóm *indica* (IR64, KDML105) đang trồng phổ biến ở nước ta (ĐBSCL) và tiến hành chuyển gen hữu dụng GNA để tạo dòng lúa biến đổi gen kháng rầy nâu.

3.5.2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

a) Vật liệu thực vật

Phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium* và máy bắn gen đã được thực hiện trên các giống lúa nhóm *indica* (IR64, KDML105) đang trồng phổ biến ở nước ta (ĐBSCL) và giống Taipei 309 thuộc nhóm *japonica* làm đối chứng.

b) Các phương pháp chuyển gen

Gen được chuyển bằng 2 phương pháp sau:

- Phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium*

Tạo mô sẹo: Hạt gạo và phôi non (2 tuần sau trổ) của các giống KDML 105, IR 64 và Taipei 309 được dùng làm vật liệu nuôi cấy.

Chuẩn bị vi khuẩn: Dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 mang plasmit pTOK233 nhận từ Công ty thuốc lá Nhật (Hei và ctv. 1994) được dùng để chuyển gen.

Vi khuẩn *A. tumefaciens*, từ ống tồn trữ trong glycerol 50%, được nuôi cấy trên môi trường AB (Chilton và ctv. 1974). Từng khuẩn lạc một của vi khuẩn được chuyển nuôi trong môi trường YEP (An và CS. 1988) có hygromycin 50mg/l và nuôi 28 - 30 giờ, ở 28°C. Dung dịch vi khuẩn này được li tâm trong 15 phút (2800 vòng/phút). Vi khuẩn thu được pha loãng trong 10ml dung dịch PIM2 chứa 100mM AS và ủ ở 29°C trong 14 -16 giờ với tốc độ lắc 200rpm (đạt mật số OD₆₀₀: 1,6-1,9), bổ sung 200mM AS trước khi chủng lên mô sẹo và phôi non.

Khử trùng bề mặt: Các hạt gạo sau khi bóc vỏ và hạt lúa từ bông lúa 2 tuần sau trổ được khử trùng bằng dung dịch Sodium hypochloride 2% trong 30 phút (2

lần), sau đó rửa lại nhiều lần với nước cất vô trùng.

Nuôi cấy phôi non: Phôi non của hạt lúa được tách dưới kính soi nổi, đặt lên môi trường lây nhiễm vi khuẩn (cocultivation medium) MSGAs với bề mặt của thuần (scutellum) hướng lên trên.

Hạt gạo: Các hạt gạo sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSCI. Sau 3 tuần, các mô sẹo có khả năng sinh phôi được tách nhỏ khoảng 1-2mm và chuyển sang môi trường tiền lây nhiễm MSCI và giữ ở 28°C khoảng 4 - 5 ngày rồi chuyển sang môi trường MSGAs.

Mỗi phôi non và mô sẹo trên môi trường MSGAs được chủng với 10 μ l dịch vi khuẩn *A. tumefaciens*, ủ 2 - 3 ngày trong tối ở 24 - 25°C. Sau 3 ngày, các phôi non và mô sẹo được chuyển sang môi trường MSRe có carbenicillin 250mg/l và cefotaxim 100mg/l để ức chế sự phát triển *A. tumefaciens*.

Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen: Sau 3 tuần, các mô sẹo phát triển từ phôi non hay từ mô sẹo được chủng với vi khuẩn được tách nhỏ thành 1 - 2mm, cấy trên môi trường chọn lọc MSSe có carbenicillin 250mg/l, cefotaxim 100mg/l và Hygromycin 30 mg/l trong 3 tuần. Các mô sẹo kháng hygromycin được tiếp tục chọn lọc trên môi trường có hygromycin 50mg/l. Các dòng kháng hygromycin được chuyển sang môi trường tăng sinh N6P trong 2 hoặc 3 tuần trước khi chuyển sang môi trường tái sinh MSRe. Các dòng kháng này được giữ trong phòng nuôi cấy có cường độ ánh sáng 2500lux, độ ẩm 70%, nhiệt độ 28°C, 16 giờ chiếu sáng/ngày. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Cây con sau đó được chuyển trồng nhà kính cho các phân tích tiếp theo.

- Chuyển gen bằng súng bắn gen

Chuẩn bị mô sẹo: Hạt gạo của các giống lúa KDML105, IR 64, Taipei 309 được dùng cho các thí nghiệm nuôi cấy mô và chuyển gen.

Hạt gạo được khử trùng như bước trên. Hạt gạo được cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSCI và nuôi trong tối ở 28°C. Theo dõi sự phát triển của mô sẹo trong 3 tuần. Các mô sẹo có dạng sinh phôi được chọn và tách nhỏ (3mm) trên môi trường N60.5 trước khi bắn gen ít nhất 4 giờ.

Quy trình bắn gen: Dòng *E.coli* mang plasmit pWG1515-*gusA*-hpt mang gen hpt kháng hygromycin và gen *gus*, pUbi-*cryIA(c)*, pUbi-GNA được dùng để chuyển vào các giống lúa.

Dòng vi khuẩn chứa các plasmit được bảo quản, tồn trữ trong glycerol 50%

(v/v) và nuôi cấy trên môi trường LB. Từng khuẩn lạc đơn của *E.coli* được nuôi trong môi trường TB chứa Ampicilline 100 mg l^{-1} và nuôi từ 15 - 18 giờ ở nhiệt độ 37°C . Dung dịch vi khuẩn này được dùng cho ly trích *plasmid*-DNA. DNA của *plasmid* được ly trích theo bộ Kit (Concert Rapid Plasmid Purification Systems, hãng Life Technologies) theo phương pháp của Birnboim và Doly (1979). DNA được pha loãng trong TE ở nồng độ $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. DNA của dòng pWG1515-*gusA*-hpt được bắn riêng lẻ hoặc cùng kết hợp với các gen hữu dụng khác. DNA này được dùng cho quy trình bắn gen.

DNA được tẩm trên các hạt vi đạn bằng vàng (Au) có kích thước 1μ , các vi đạn mang DNA được bắn vào mô sẹo đã nuôi 4 giờ trên môi trường N6 nhờ máy bắn gen Biolistic PDS-1000 He với các khoảng cách và áp lực bắn khác nhau.

Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen: Sau khi bắn 20 - 24 giờ, các mô sẹo được chuyển sang môi trường phục hồi MSCI để nhân mô sẹo. Sau 2 tuần, các mô sẹo được tách nhỏ 1 - 2mm và chuyển sang môi trường chọn lọc MSSe có hygromycin 30 mg/l . Sau 3 tuần, các mô sẹo sống sót được tách nhỏ và chuyển sang môi trường chọn lọc lần thứ 2 có hygromycin 50 mg/l .

Các dòng kháng hygromycin và phát triển qua 2 lần chọn lọc được chuyển qua môi trường N6P (nhân nhanh mô sẹo) và theo dõi sự phát triển của mô sẹo từ 2 - 3 tuần. Các mô sẹo phát triển tốt được chuyển sang môi trường tái sinh MSRe và nuôi ở 28°C trong tối 1 tuần trước khi được chuyển đến phòng sáng có ẩm độ 70%, nhiệt độ 28°C và thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Sau khi rễ đã phát triển đầy đủ cây con chuyển vào chậu đất và trồng ở nhà kính.

c) Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen

Việc đánh giá cây chuyển gen được tiến hành theo hai mức độ chính là ở phòng thí nghiệm và trong nhà kính.

- Trắc nghiệm sự biểu hiện gen *gus*

Trắc nghiệm sự biểu hiện tạm thời (transient assay) gen *gus* trong tế bào được chuyển gen được thực hiện ở các mô sẹo vào ngày thứ 3 sau khi chủng hoặc bắn, trắc nghiệm sự biểu hiện ổn định (stable assay) ở các mô sẹo phát triển tốt qua chọn lọc trước khi tái sinh và ở cây tái sinh (Jefferson, 1987).

Các vật liệu gồm mô sẹo được chủng *A. tumefaciens* hoặc bắn gen sau 3 ngày và đoạn phiến lá dài 5 - 10mm của các cây tái sinh được chuyển vào lỗ của đĩa nhiều giếng có chứa dung dịch X-Gluc. Quan sát sự biểu hiện gen *gus*, sau 24 giờ

ủ ở 37°C các mẫu có những điểm màu xanh. Diệp lục tố trong lá được tẩy bằng hỗn hợp acetone: methanol (1:3).

- Thử nghiệm sinh học tính kháng đối với rầy nâu

Vật liệu dụng cụ: Dụng cụ nuôi rầy (lồng, khay, chậu nhỏ, thuốc trừ nấm...); Dụng cụ chọn lọc rầy (lồng kính, khay nhỏ, pen, thước, thẻ nhỏ...); Giống lúa Tài Nguyên mùa làm thức ăn cho rầy (30 - 45 ngày tuổi); Giống Ptb33 làm giống chuẩn kháng, giống TN1 làm chuẩn nhiễm; Các dòng lúa chuyển gen cần chọn lọc.

Phương pháp: Chọn lọc theo phương pháp hộp mạ của IRRI, có chỉnh sửa cho phù hợp với điều kiện của nước ta. Giống được ngâm ủ nhú mầm, cấy trong khay bùn mịn thành hàng, 5 lần nhắc lại kể cả TN1 và Ptb33. Thả rầy đồng (cùng) tuổi 2 hoặc 3 khi cây mạ 2 hoặc 3 lá (2 - 4 ngày sau khi cấy) với mật số 4 - 6 con/tép. Đánh giá khi giống chuẩn nhiễm cháy rụi ở cấp 9 (7 - 10 ngày sau khi thả rầy), theo thang điểm cấp 9 của IRRI.

3.5.2.3. Kết quả thực hiện chuyển gen

a) Tiêu chuẩn hóa quy trình chuyển gen bằng *A. tumefaciens*

Sự biểu hiện tạm thời của phản ứng *gus* thể hiện plasmit đã chuyển vào tế bào chủng với *A. tumefaciens*.

Qua 3 lần thử nghiệm, tỷ lệ mô sẹo có phản ứng *gus* khác nhau tùy giống, nhìn chung còn thấp, khoảng 6 - 12,5% trên các giống *indica* so với giống *japonica* đối chứng, 22 - 38% (Bảng 29).

Bảng 29. Tỷ lệ có biểu hiện GUS ở các giống lúa thí nghiệm

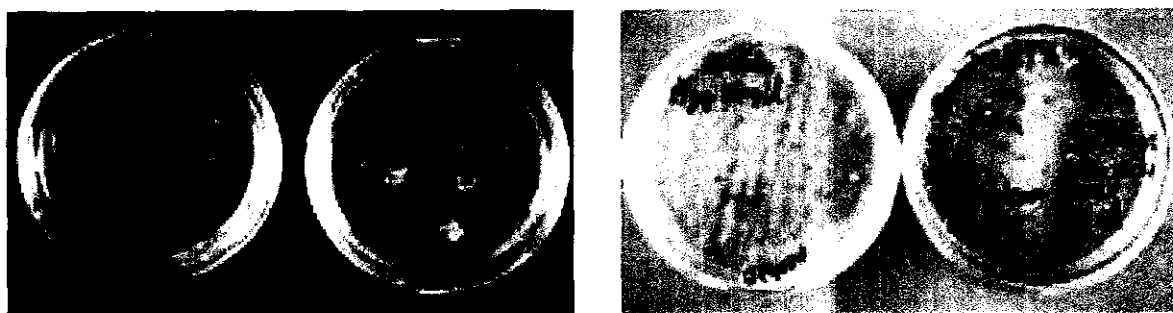
STT	Tên giống	Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện <i>gus</i> tạm thời (%)		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	Taipei 309	24,0	22,7	38,2
2	KDML105	8,0	10,0	12,5
3	IR64	6,0	0	10,0

Bảng 30. Số dòng tái sinh từ các mô sẹo qua chọn lọc

STT	Tên giống	Số dòng tái sinh	Số dòng biểu hiện <i>gus</i> dương tính
1	Taipei 309	7	3
2	KDML105	5	2
3	IR64	4	3

309; 5 dòng KDML105 và 4 dòng IR64.

Trắc nghiệm sự biểu hiện *gus* trên lá các dòng tái sinh cho thấy, số dòng cho phản ứng *gus* dương tính ít hơn số dòng tái sinh (Bảng 30) có thể do các dòng thoát khỏi sự chọn lọc (escape) hoặc đoạn DNA được chuyển bị loại trừ khỏi tế bào trong quá trình phân chia, phân hóa.



Hình 59. Sự sống sót và phát triển của các mô sẹo trên môi trường chọn lọc (Hyg 50 mg/l) sau 2 tuần nuôi cấy



Hình 60. Cây chuyển gen KDML105 tái sinh và sự biểu hiện gen *gus*

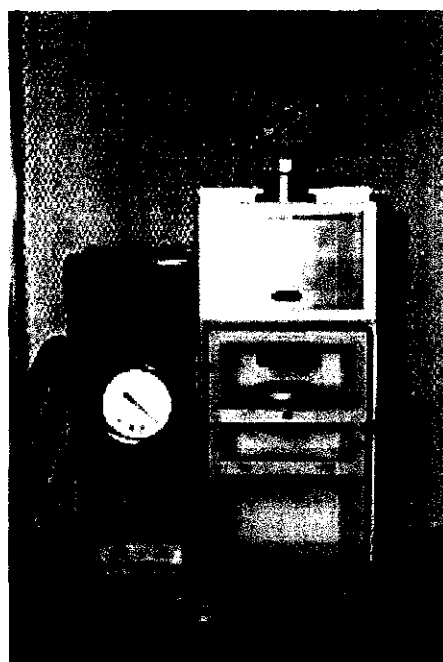
b) Tiêu chuẩn hóa chuyển gen bằng súng bắn gen

Máy bắn gen Biorad được sử dụng (Hình 61). Các áp lực và khoảng cách bắn khác nhau được thử nghiệm để tìm ra các thông số bắn thích hợp. Kết quả cho thấy khi bắn ở khoảng cách A với áp lực 900, 1100psi (pound per square inch) cho kết quả tốt hơn khi bắn ở các thông số khác.

Khi bắn ở khoảng cách A với áp lực 1350psi, tuy cho tỷ lệ phản ứng GUS tạm thời cao, nhưng tỷ lệ mô sẹo phát triển qua chọn lọc thấp hơn ở áp lực 900 và 1100psi, có thể do áp lực cao làm tổn thương các tế bào mô sẹo (Bảng 31).

Bảng 31. Ảnh hưởng thông số bắn trên hiệu quả chuyển gen ở giống Taipei 309

Khoảng cách	Áp lực (psi)	Phản ứng GUS tạm thời (%)	Tỷ lệ mô sẹo sống sau chọn lọc (%)
A (rack1-3)	900	12	7,3
	1100	14	9,7
	1350	16	5,2
B (rack 2-4)	900	2	0
	1100	4	0
	1350	2	0



Hình 61. Máy bắn gen PSD He1100

Sau khi thử nghiệm các thông số bắn thích hợp, các giống lúa đang trồng phổ biến tại ĐBSCL được thử nghiệm khả năng tương thích với hệ thống chuyển gen.

Tỷ lệ mô sẹo có phản ứng GUS tạm thời khác nhau tùy giống, nhưng còn rất thấp ở các giống *indica* so với giống *japonica* đối chứng (Bảng 32).

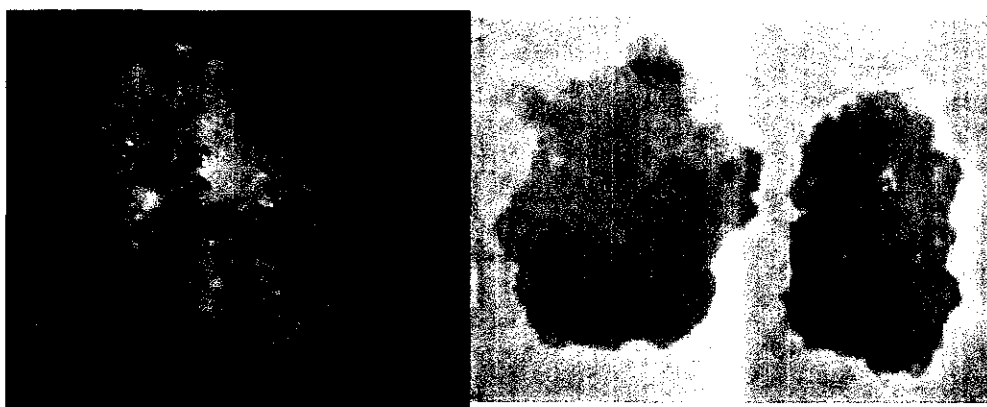
Bảng 32. Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện GUS của các giống lúa

STT	Tên giống	Phản ứng GUS tạm thời (%)	Tỷ lệ mô sẹo sống sau chọn lọc (%)
1	Taipei 309	14,6	10,8
2	KDML105	9,5	7,7
3	IR64	12	8,5

Bảng 33. Số dòng tái sinh từ các giống được chuyển gen

STT	Tên giống	Số cây tái sinh
1	Taipei 309	5
2	KDML105	3
3	IR64	2

Qua chọn lọc và tái sinh các mô sẹo sống sót, thu được 5 dòng Taipei 309; 3 dòng KDML105; 2 dòng IR64 (Bảng 33). Các dòng tái sinh này được thử nghiệm sự biểu hiện *gus* (Hình 62) và được chuyển sang trồng trên đất trong nhà lưới và phát triển bình thường (Hình 63, 64).

**Hình 62.** Kết quả thử nghiệm sự biểu hiện tạm thời gen *gus***Hình 63.** Các dòng chuyển gen trồng trong nhà kính**Hình 64.** Sự sinh trưởng bình thường của cây chuyển gen

c) Kết quả chuyển gen kháng sâu GNA vào lúa

Sau khi tiêu chuẩn hóa phương pháp chuyển gen, hai gen hữu dụng GNA (trên plasmit pUbi-GNA) được chuyển vào các giống lúa KDML105, IR64 và Taipei309 (*japonica*) bằng súng bắn gen. Gen GNA được biết tạo tính kháng rầy nâu, gen *cryIA(c)* tạo tính kháng sâu đục thân.

Kết quả chuyển nạp gen GNA được tóm tắt ở Bảng 34. Ở áp lực 1100A, giống KDML105 cho tỷ lệ mô sẹo sống qua chọn lọc lần 2 đạt 8,3% so với giống Taipei309 đạt 12,7%. Giống IR64 có tỷ lệ thấp hơn, 3,9%.

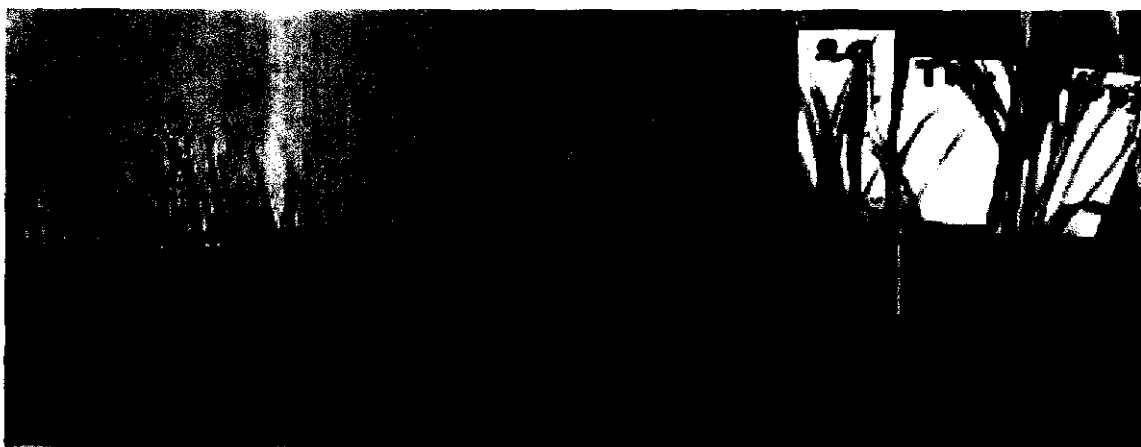
Bảng 34. Kết quả chuyển gen plasmid pUbi-GNA

Tên giống	Tỷ lệ mô sẹo sống sau chọn lọc lần 1 (%)		Tỷ lệ mô sẹo sống sau chọn lọc lần 2 (%)		Số dòng tái sinh
	900A	1100A	900A	1100A	
KDML105	16,8	22,6	6,7	8,3	9
IR64	13,2	14,4	6,4	3,9	6
Taipei 309	20,8	21,3	9,6	12,7	12

d) Thử nghiệm tính kháng rầy nâu của các dòng nhận gen GNA

Các dòng biến đổi gen GNA thế hệ T4 được thử nghiệm tính kháng rầy nâu với giống chuẩn kháng *Ptb33* mang gen kháng *Bph2* và *Bph3*, giống chuẩn nhiễm TN1 không mang gen kháng.

Kết quả được trình bày ở Bảng 34 cho thấy trong các dòng lúa KDML105 chuyển gen GNA, một dòng T29 (14-1-2-5-2) có tính kháng cấp 3, so với giống chuẩn kháng cấp 1, chuẩn nhiễm cấp 9, giống bố mẹ gốc KDML105 cấp 9. Tỷ lệ dòng biến đổi gen cho phản ứng cấp 5 chiếm tỷ lệ 35,4% (17/48 dòng). Giống lúa có cấp kháng rầy nâu 3 - 5 trong thử nghiệm nhà lưới thường kháng rầy nâu trong điều kiện ngoài đồng. Các giống lúa đang trồng trong sản xuất hiện nay hầu như chưa có giống nào có tính kháng cấp 1.



Hình 65. Thử nghiệm tính kháng rầy nâu của các dòng lúa chuyển gen GNA

Bảng 35. Kết quả thử rầy đối với các dòng lúa KDML105 chuyển gen GNA

STT	Ký hiệu	Dòng	Cấp hại	Phản ứng
1	T1	12-1- 1-1-1	7	N
2	T2	12-1-1-1-2	7	N
3	T3	12-1-1-2-1	5	HN
4	T4	12-1-1-2-2	5	HN
5	T5	12-1-1-3-1	7	N
6	T6	12-1-1-4	7	N
7	T7	12-1-2-1-1	9	RN
8	T8	12-1-2-1-2	Không thử	Không thử
9	T9	12-1-3-1-1	7	N
10	T10	12-1-3-2-1	7	N
11	T11	13-1-1-2-1	7	N
12	T12	13-1-4-1-1	7	N
13	T13	13-1-5-1-1	7	N
14	T14	13-1-6-1-1	7	N
15	T15	13-1-4-2-1	7	N
16	T16	13-1-6-1-2	5	HN
17	T17	13-1-2-1-2	5	HN
18	T18	13-1-2-1-1	7	N
19	T19	13-1-3-1-1	7	N
20	T20	13-1-3-1-2	5	HN
21	T21	14-1-1-1-1	7	N
22	T22	14-1-1-2-1	5	HN
23	T23	14-1-1-6-1	7	N
24	T24	14-1-1-7-1	7	N
25	T25	14-1-1-7-2	5	HN
26	T26	14-1-1-8-1	5	HN
27	T27	14-1-2-3-1	5	HN
28	T28	14-1-2-5-1	5	HN
29	T29	14-1-2-5-2	3	HK
30	T30	14-1-2-6-1	7	N
31	T31	14-1-2-6-1	5	HN
32	T32	14-1-2-6-2	5	HN
33	T33	14-1-3-2-1	7	N
34	T34	14-1-3-2-1	7	N
35	T35	14-1-4-1-1	7	N
36	T36	14-1-4-4-1	5	HN
37	T37	14-1-5-4-1	5	HN

38	T38	14-1-6-4-1	5	HN
39	T39	14-1-7-6-1	7	N
40	T40	14-1-7-6-1	5	HN
41	T41	14-1-7-6-1	Không thử	Không thử
42	T42	14-1-7-6-1	7	N
43	T43	14-1-8-2-1	7	N
44	T44	14-1-8-2-2	5	HN
45	T45	14-1-8-3-1	7	N
46	T46	14-1-8-5-1	7	N
47	T47	14-1-8-5-2	7	N
48	T48	14-1-9-2-1	7	N
49	T49	16-1-1-1-1	7	N
50	T50	16-1-1-1-2	7	N
51	TN1	Chuẩn nhiễm rầy	9	RN
52	PTB3	Chuẩn kháng rầy	1	K
53	KDML105	Giống bố mẹ		

** T8 và T41 không đủ hạt để thử rầy

e) Kết luận về chuyển gen kháng rầy vào cây lúa

Từ các kết quả trên, cho thấy có thể áp dụng các hệ thống chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* hay dùng súng bắn gen đã được tiêu chuẩn hóa trong điều kiện phòng thí nghiệm của Viện lúa ĐBSCL để chuyển các gen hữu dụng vào cây lúa.

Các dòng tái sinh được chuyển gen với plasmid pUbi-GNA (mang gen kháng rầy nâu GNA) sinh trưởng bình thường trong nhà kính, biểu hiện sự kháng rầy nâu ở cấp 3 - 5.

3.5.3. Chuyển gen *cryIA(b,c)* kháng sâu và gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá vào cây lúa thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

3.5.3.1. Cơ sở khoa học và thực tiễn của việc chuyển gen kháng sâu đục thân vào cây lúa

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một loại cây trồng quan trọng. Hơn một nửa dân số trên thế giới sử dụng lúa như nguồn cung cấp lương thực chính. Ở Việt Nam, lúa được trồng rộng rãi và là nguồn lương thực quan trọng nhất. Tuy nhiên, năng suất lúa phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện ngoại cảnh như khí hậu, thời tiết, đặc điểm thổ nhưỡng và sâu bệnh. Hiện nay, sự phát triển của công nghệ sinh học, đặc biệt là kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật di truyền và kỹ thuật phân tử cho phép các nhà tạo giống nâng cao tính chống chịu của cây trồng một cách nhanh chóng.

Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ngày càng được ứng dụng rộng rãi để chuyển một hay nhiều gen vào cây trồng. Tính ưu việt của hệ thống chuyển gen này là hiệu quả tạo cây chuyển gen bền vững cao, có thể chuyển một đoạn ADN có kích thước tương đối lớn, không cần đến thiết bị cũng như hệ thống nuôi cấy phức tạp. Ngoài ra, lượng bản sao gen chuyển ít tạo thuận lợi trong việc phân tích cũng như biểu hiện gen mới trong cây chuyển gen. Những năm gần đây bắt đầu có những kết quả nghiên cứu về khả năng chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở cây lúa trong đó đã chuyển gen thành công cả ở lúa *japonica* và lúa *indica*, lúa *indica* có khả năng tái sinh và chuyển gen thấp hơn so với lúa *japonica*.

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là dùng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* để tạo cây lúa mang các gen kháng sâu bệnh đặc biệt gen kháng sâu đục thân. Vì đối với loại sâu hại này, biện pháp phòng trừ bằng dùng giống kháng không đem lại kết quả. Hơn 30 năm qua Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế đã chọn lọc tính kháng sâu đục thân cho hơn 30.000 giống lúa nhưng chưa tìm ra giống kháng (IRRI, 1995). Do vậy, chuyển gen kháng sâu đục thân vào cây lúa bằng công nghệ gen là phương pháp nhiều hứa hẹn, việc tạo ra các giống lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân sẽ giúp giảm lượng thuốc trừ sâu, tiết kiệm chi phí và giảm ô nhiễm môi trường.

Một số tác giả thông báo đã tạo được các dòng lúa *japonica* và *indica* chuyển gen *Bt* kháng được sâu đục thân màu hồng, sâu đục thân sọc, sâu đục thân màu vàng và sâu cuốn lá (Fujimoto và CS, 1993; Duan và CS, 1996; Nayak và CS, 1997; Datta và CS, 1998). Wu và CS, 2002 báo cáo giống lúa *japonica* chuyển gen *cry1A(b)* tạo được tính kháng sâu đục thân ổn định ở thế hệ R6 và trong điều kiện thí nghiệm ngoài đồng. Tuy nhiên, chưa thấy có báo cáo về việc tạo dòng lúa biến đổi gen *Bt* trên nền giống có đặc tính nông học tốt. Hơn nữa, trong chuyển gen ở cây trồng, hệ thống chọn lọc cây biến đổi gen thông dụng nhất là sử dụng thuốc kháng sinh hoặc thuốc trừ cỏ. Các tế bào đã biến đổi gen có khả năng phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy có chứa chất kháng sinh (thường dùng nhất là hygromycin) hoặc chất trừ cỏ (thường dùng nhất là PPT). Việc sử dụng các hệ thống chọn lọc này gây nhiều lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen đối với môi trường và sức khỏe con người. Nhằm khắc phục nhược điểm này, gần đây một phương pháp chọn lọc mới đã được ứng dụng, đó là hệ thống chọn lọc bằng mannose.

Hệ thống chọn lọc này dựa trên việc sử dụng gen *pmi*- được phân lập từ *Escherichia coli*- làm gen chỉ thị để điều khiển tạo ra enzyme phosphomannose isomerase (Miles và Guest, 1984). Trong môi trường nuôi cấy có thêm mannose, tế

bào đối chứng không mang gen *pmi*, enzyme hexokinase trong các tế bào làm biến đổi mannose thành mannose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây không sử dụng nên không phát triển được. Ngược lại, các tế bào có mang gen *pmi*, enzyme phosphomannose isomerase được tạo ra làm chuyển hóa mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây có thể sử dụng cho sự sinh trưởng phát triển. Vì vậy, chỉ có cây trồng có mang gen *pmi* mới có khả năng phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy có chứa mannose, trong khi các cây không có gen *pmi* không phát triển được. Hệ thống chọn lọc bằng mannose đã được áp dụng trong tạo cây biến đổi gen ở cây củ cải đường (Joersbo và CS, 1998), bắp, lúa mì (Wright và CS, 2001) và lúa *indica* (Hoa và Bong, 2003).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo cây biến nạp gen *cryIA(b)* và *cryIA(c)* kháng sâu bằng *Agrobacterium* và sử dụng hai hệ thống chọn lọc bằng mannose và chọn lọc bằng kháng sinh trên các giống lúa có đặc tính nông học và phẩm chất tốt. Mục đích so sánh hai hệ thống chọn lọc nhằm tìm ra phương pháp tối ưu cho công nghệ chuyển gen ở cây lúa và giải pháp khắc phục các mối lo ngại về tính an toàn của cây biến đổi gen hiện nay.

3.5.3.2. Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân và kháng bệnh bạc lá thông qua *A. tumefaciens* và chọn lọc bằng Hyg

a) Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

- Vật liệu

Mô sẹo 15 - 25 ngày tuổi từ hạt của giống lúa C71 do (Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp), được dùng làm vật liệu để chuyển gen.

Chủng/vector LBA4404/pC1300, LBA4404/pC1301 mang gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá và gen *CryIA(b)* kháng sâu đục thân. Vector EHA105/pC1300 mang gen *CryIA(c)* kháng sâu đục thân. Các vector này đều mang gen chọn lọc kháng hygromycin *hpt*.

- Phương pháp nghiên cứu

Tạo mô sẹo: Hạt lúa C71 bóc vỏ, khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút, nước giaven 60% trong 25 phút, rửa kỹ bằng nước cất tiệt trùng 3 lần. Hạt đã khử trùng được thấm khô trên giấy thấm tiệt trùng và cấy lên môi trường tạo mô sẹo (MS*; 30g/l saccharose; 10g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D) nuôi trong tối, ở nhiệt độ 25±2°C.

Tạo dịch huyền phù *A. tumefaciens*, nhiễm mô sẹo và nuôi cộng sinh: Khuẩn được lấy từ glycerol nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 220v/p ở 28°C trong 12 - 14 giờ.

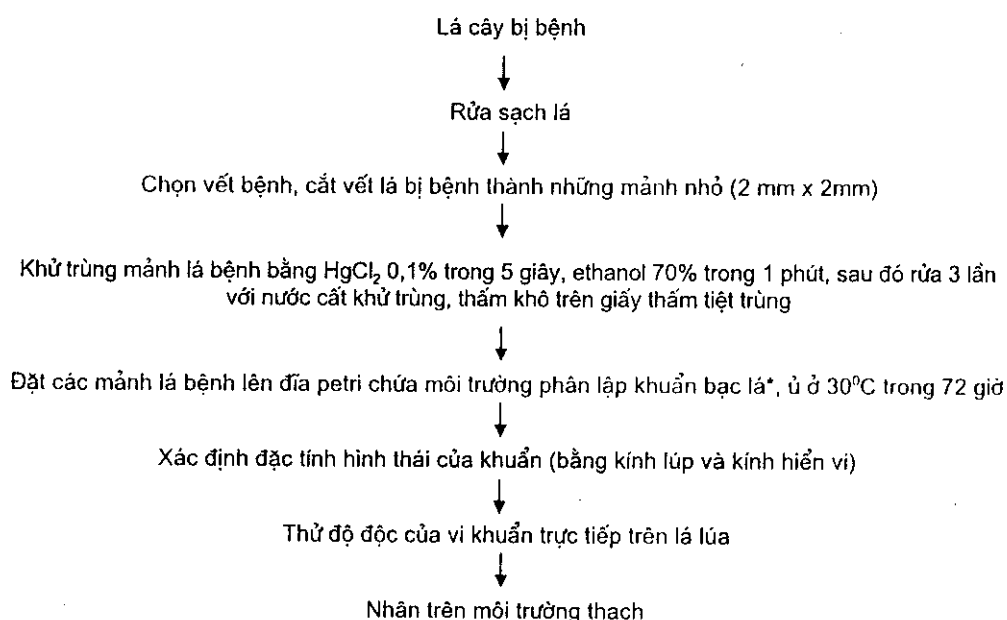
Cấy quệt trên môi trường LB thạch có bổ sung kanamycin 50mg/l, nuôi ở 29°C trong 3 ngày. Lấy một khuẩn lạc vi khuẩn lactic 220v/p, 28°C qua đêm trong 100ml môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin 50mg/l. Lấy ra 4ml cho vào môi trường LB lỏng mới, nuôi lactic tiếp 4 giờ trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào rồi hoà tan vào môi trường MS lỏng có bổ sung AS để tăng hiệu quả chuyển gen (Hood E.E & CS, 1993; Ian Godwin & CS, 1990).

Mô sẹo lúa 15-18 ngày tuổi, được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có mật độ $OD_{660}=0.2-0.4$ ($1.0 OD_{660}=3.10^9$ tế bào) trong 15 phút. Sau khi thấm khô dịch môi trường trên giấy lọc khử trùng, mô sẹo được nuôi cộng sinh (môi trường tạo mô sẹo có bổ sung 50 μ M AS) với vi khuẩn trong 3 ngày ở nhiệt độ $25\pm 2^\circ\text{C}$, trong tối.

Chọn lọc mô sẹo, chuyển gen và tái sinh cây: Sau ba ngày, mô sẹo được ngâm và rửa vi khuẩn trong môi trường lỏng nuôi mô sẹo có bổ sung 300mg/l cefotaxime. Sau khi thấm khô trên giấy thấm, mô sẹo được cấy lên môi trường chọn lọc có chứa 50mg/l hygromycin và 250mg/l cefotaxime trong 3 - 4 tuần. Những mô sẹo sống sót được cấy chuyển lên môi trường tái sinh, đặt dưới giàn đèn 2000lux, chu kì sáng tối với tỉ lệ 8h sáng/16h tối, ở nhiệt độ $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Phân lập khuẩn bạc lá: Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* được phân lập từ lá lúa bị bệnh bạc lá (do Bộ môn Bệnh hại lúa, Viện Bảo vệ thực vật cung cấp) theo sơ đồ sau:

Sơ đồ 1. Phân lập vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* từ lá lúa bị bệnh bạc lá



(*) Môi trường phân lập khuẩn *Xanthomonas oryae* là môi trường khoai tây bán tổng hợp của Wakimoto [11], thành phần môi trường gồm có:

Khoai tây:	300g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:	0,5g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$:	2g
Pepton:	5g
Saccharoza:	20g
Agar:	17-20g

Dẫn nước cất đến 1 lít, pH 6,8 - 7

b) Kết quả và thảo luận

i) Chọn lọc mô sẹo và tái sinh cây

Tỷ lệ tạo mô sẹo ở giống lúa C71 khoảng 92% cao tương đương với tỷ lệ tạo mô sẹo của giống lúa *Binatoa (indica)* do Noorain và CS thực hiện.

Sau 3 - 4 tuần chọn lọc trên môi trường có hygromycin, các mô sẹo đối chứng không nhiễm khuẩn và một số mô sẹo nhiễm khuẩn bắt đầu chuyển dần sang màu nâu đen (Hình 67.1).



Hình 66. Tạo mô sẹo ở giống lúa C71

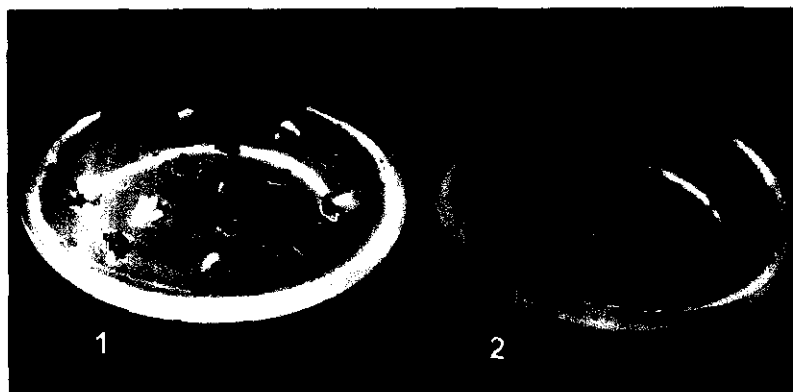
1. Hạt bắt đầu tạo mô sẹo; 2. Mô sẹo 14 ngày tuổi



Hình 67. Mô sẹo trên môi trường chọn lọc

1. Mô sẹo mới đưa vào chọn lọc; 2. Mô sẹo sau 3 tuần chọn lọc

Các mô sẹo đối chứng chuyển sang màu nâu đen rõ rệt so với các mô sẹo nhiễm khuẩn. Hầu hết các mô đối chứng đều chết sau 4 tuần chọn lọc (Hình 68).



Hình 68. Chọn lọc mô sẹo

1. Mô sẹo đã nhiễm khuẩn sau 3 tuần chọn lọc; 2. Mô sẹo không nhiễm khuẩn sau 3 tuần chọn lọc

Qua thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy mô sẹo từ 15 - 18 ngày tuổi dùng cho chuyển gen là tốt nhất. Kết quả thu được tỷ lệ mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc trên môi trường có hygromycin cao hơn Noorain và cộng sự thực hiện khoảng 15%.

Do khả năng tái sinh của lúa *indica* đã được Fauquet và CS chứng minh là thấp hơn so với lúa *japonica* nên để rút ngắn thời gian đồng thời tăng khả năng tái sinh của cây lúa chuyển gen, các mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc 3 - 4 tuần được chuyển lên môi trường R thay vì chọn lọc từ 6 - 8 tuần ở lúa *japonica*.

Các mô sống sót này cho cây tái sinh sau khoảng 50 - 60 ngày (Hình 69).



Hình 69. Cây tái sinh

1. Cây tái sinh sau 15 ngày; 2. Cây tái sinh sau 50 ngày, đã tạo rễ

Các cây được tách riêng từ cụm cây tái sinh và sau đó cấy chuyển lên môi trường R chọn lọc có hygromycin nồng độ 50mg/l, chọn lọc từ 10 - 12 ngày, đối chứng là cây lúa C71 không chuyển gen và cây lúa C71 chuyển gen đã có kết quả PCR gen *hpt* dương tính. Tỷ lệ cây tái sinh và kết quả được trình bày ở Bảng 36.

Bảng 36. Kết quả chọn lọc và tái sinh cây

TN	Số mô sẹo xử lý nhiễm khuẩn	Số mô sẹo sống sau chọn lọc / số mô sẹo chọn lọc	Số mô sẹo tái sinh	Số cây con	Số cây sống sau thử trên môi trường hygromycin/ Tổng số cây
Gen Cry IA (c) (gen kháng sâu đục thân)					
1	750	300/ 750 (40%)	42 cụm cây tái sinh	631	56/631 (8.9%)
2	400	80/ 400 (20%)			
3	1600	400/ 1600 (25%)			
4	500	200/500 (40%)			
5	250	100/ 250 (40%)			
Gen Cry IA (b) (gen kháng sâu đục thân)					
1	1300	503/ 1300 (38%)	78 cụm cây tái sinh	1015	51/1015 (5%)
2	600	430/ 1300 (33%)			
3	700				
Gen Xa21 (gen kháng vi khuẩn <i>Xanthomonas oryzae</i> gây bệnh bạc lá)					
1	500	127/ 500 (25%)	53 cụm cây tái sinh	2032	174/ 2032 (8,6%)
2	500	114/ 500 (23%)			
3	500	145/ 500 (29%)			

Tỷ lệ cây sống sót thu được so với tổng số cây chọn lọc sau khi chọn lọc trên môi trường có hygromycin khoảng 5% - 8,9%.

ii) *Kết quả kiểm tra PCR sự có mặt của gen cryIA(c) và trồng thử nghiệm ngoài nhà lưới*



Hình 70. Kết quả nhân đoạn gen cryIA(c) bằng kỹ thuật PCR

M. Marker 1kb; 1.Plasmid pC1300/CryIA(c); 6, 7, 12. Dương tính; 2-5, 8-11, 13, 14. Âm tính

Kết quả cho thấy ADN tổng số của các dòng cây chuyển gen sống trên môi trường hygromycin được tách theo phương pháp của Egnin và CS có chất lượng tốt đủ điều kiện để tiến hành phản ứng PCR và các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo. Các primer dùng để kiểm tra sự có mặt của gen cryIA(c) và cryIA(b) được thiết kế theo chương trình **DNA Star**.

Phản ứng PCR được dùng để kiểm tra cây chuyển gen cryIA(c). Kết quả kiểm tra 45 dòng cây chuyển gen thu được 5 dòng cây dương tính thể hiện ở các cột 6, 7, 9, 10,

12 trên hình 70 đạt 6,6%. Tỷ lệ cây chuyển gen này cao hơn so với các kết quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào lúa *indica* đã đạt được trước đây. Các cây chuyển gen *cryIA(c)* có kết quả PCR dương tính được đem trồng ngoài nhà lưới sinh trưởng và phát triển bình thường, không có biểu hiện gì khác lạ. Chúng tôi đã thu hạt thế hệ T1 của các dòng cây dương tính này. Một số hạt của các dòng cây T1 này đã được kiểm tra bằng PCR và đã thu được một dòng cây T1/26 dương tính.

iii) Kết quả lây nhiễm bệnh bạc lá

Các mảnh lá lúa bị bệnh bạc lá sau khi được khử trùng, đặt lên đĩa petri chứa môi trường phân lập sẽ được ủ trong tủ ẩm ở 30°C. Sau 72 giờ, các đĩa petri có khuẩn mọc sẽ được lấy ra khỏi tủ ẩm, đầu tiên quan sát bằng mắt thường, sau đó cấy trải để thu được khuẩn lạc, nhận dạng khuẩn lạc bằng kính lúp và kính hiển vi. Tiến hành thử độc tính của vi khuẩn phân lập được trực tiếp trên lá lúa. Kết quả là đã phân lập được khuẩn *Xanthomonas oryzae* gây bệnh bạc lá ở lúa.



Hình 71. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* mọc trên môi trường phân lập

Sau khi lây nhiễm bệnh bạc lá cho 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* (kháng hygromycine) và cây C71 không chuyển gen (đối chứng). Đánh giá khả năng kháng bệnh của các dòng lúa sau 7 ngày và 14 ngày lây nhiễm bệnh. Thời gian thí nghiệm được bố trí vào cuối tháng 7 và đầu tháng 8, đây là thời điểm có nhiệt độ và thời gian chiếu sáng trong ngày rất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của khuẩn *Xanthomonas oryzae*. Kết quả về phản ứng với bệnh bạc lá của 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* và cây đối chứng không chuyển gen sau hai lần lây nhiễm bệnh được trình bày trong Bảng 38.

- Lây nhiễm bệnh bạc lá

Những dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* được xác định là kháng hygromycine và cây C71 không chuyển gen (đối chứng) sau 2 tuần nuôi trên môi trường MS 1/10 được đưa ra trồng trong các chậu ngoài nhà lưới (05 cây/1 chậu). Thành phần các chất dinh dưỡng trong đất và chế độ chăm sóc ở tất

cả các chậu là như nhau. Đất trồng cây được trộn theo tỉ lệ: đất : mùn : phân gà = 5 : 5 : 3 và NPK = 1,5 - 2%.

Khi cây lúa có 5 - 6 lá (6 tuần tuổi), bắt đầu tiến hành lây nhiễm bệnh bạc lá cho cây chuyển gen và cây đối chứng. Phương pháp lây nhiễm bệnh bạc lá: cắt lá lúa bằng kéo nhúng dịch khuẩn, mật độ khuẩn khoảng 10^9 tế bào/ml, khoảng cách từ đầu lá tới vị trí cắt là 3 - 4cm. Trong 3 ngày đầu các chậu lúa được đặt dưới mái che. Thí nghiệm được nhắc lại 2 lần.

Khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen sẽ được đánh giá sau 7 ngày và 14 ngày, kể từ ngày lây nhiễm bệnh. Mức độ nhiễm bệnh được đánh giá theo thang phân cấp tiêu chuẩn của Viện nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI).

Bảng 37. Thang điểm đánh giá tình trạng nhiễm bệnh đối với lúa

Điểm	% lá bị bệnh
1 (kháng cao)	Dưới 1% lá bị bạc (bằng giống tiêu chuẩn chống bệnh)
3 (kháng khá)	1% - 5%
5 (nhiễm trung bình)	5% - 25%
7 (nhiễm nặng)	25% - 50%
9 (nhiễm rất nặng)	Trên 50% lá bị bạc (bằng giống tiêu chuẩn nhiễm bệnh)

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\% lá bị bệnh)} = \frac{\text{Số lá bị bệnh} \times 100}{\text{Tổng số lá}}$$

- Kết quả

Sau khi lây nhiễm bệnh bạc lá cho 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* (kháng hygromycine) và cây C71 không chuyển gen (đối chứng). Đánh giá khả năng kháng bệnh của các dòng lúa sau 7 ngày và 14 ngày lây nhiễm bệnh. Thời gian thí nghiệm được bố trí vào cuối tháng 7 và đầu tháng 8, đây là thời điểm có nhiệt độ và thời gian chiếu sáng trong ngày rất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của khuẩn *Xanthomonas oryzae*. Kết quả về phản ứng với bệnh bạc lá của 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* và cây đối chứng không chuyển gen sau hai lần lây nhiễm bệnh được trình bày trong Bảng 38.

Bảng 38. Tỷ lệ bệnh và tình trạng nhiễm bệnh của 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo chuyển gen Xa21 sau 7 và 14 ngày lây nhiễm bệnh bạc lá với khuẩn Xan

Tên dòng	Kết quả lây nhiễm bệnh lần 1						Kết quả lây nhiễm bệnh lần 2					
	Sau 7 ngày			Sau 14 ngày			Sau 7 ngày			Sau 14 ngày		
	% lá bệnh	% so với ĐC	Điểm	% lá bệnh	% so với ĐC	Điểm	% lá bệnh	% so với ĐC	Điểm	% lá bệnh	% so với ĐC	Điểm
ĐC	19,52	100,0	5	22,46	100,0	5	21,68	100,0	5	24,40	100,0	5
1	29,87	153,0	7	34,52	153,7	7	38,64	178,2	7	44,65	183,0	7
2	34,67	177,6	7	39,36	175,2	7	32,56	150,1	7	38,51	157,8	7
3	38,26	196,0	7	49,03	218,3	7	36,70	169,3	7	49,18	201,5	7
4	24,24	124,2	5	24,44	108,8	5	25,42	117,3	7	28,48	116,7	7
5	12,20	62,5	5	19,69	87,7	5	18,32	84,5	5	22,13	90,7	5
6	46,08	236,1	7	51,09	227,5	9	43,26	199,5	7	48,70	199,5	7
7	40,91	209,6	7	42,86	190,8	7	47,10	217,3	7	55,66	228,1	9
8	12,68	65,0	5	14,18	63,1	5	8,91	41,1	5	13,60	55,7	5
9	13,30	68,1	5	16,97	75,6	5	7,58	35,0	5	11,40	46,7	5
10	11,39	58,4	5	14,13	62,9	5	12,50	57,7	5	14,81	60,7	5
11	28,07	143,8	7	28,72	127,9	7	21,48	99,1	5	25,50	104,5	7
12	18,26	93,6	5	24,63	109,7	5	22,16	102,2	5	25,89	106,1	7
13	16,17	82,8	5	19,33	86,1	5	15,42	71,1	5	17,39	71,3	5
14	26,14	133,9	5	29,27	130,3	7	24,60	113,5	5	27,63	113,2	7
15	6,40	27,7	5	7,08	27,1	5	7,15	33,0	5	9,84	40,3	5
16	6,74	34,5	5	8,25	36,3	5	6,59	30,4	5	8,73	35,8	5
17	18,75	96,1	5	20,64	91,9	5	21,06	97,1	5	22,35	91,6	5
18	12,82	65,7	5	16,16	72,0	5	8,99	41,5	5	10,60	43,4	5
19	46,23	236,8	7	54,63	243,2	9	42,31	195,2	7	48,02	196,8	7
20	16,38	83,9	5	20,26	90,2	5	22,54	104,0	5	25,5	104,5	7
21	6,60	33,8	5	9,45	37,6	5	8,37	38,6	5	15,02	61,6	5
22	5,13	26,3	5	6,67	29,7	5	7,63	35,2	5	13,68	56,1	5
23	22,56	115,6	5	25,46	113,4	7	24,80	114,4	5	27,36	112,1	7
24	44,94	230,2	7	53,39	237,7	9	39,49	182,2	7	41,57	170,4	7
25	20,73	106,2	5	27,37	121,9	7	26,57	122,6	7	28,13	115,2	7
26	42,63	218,4	7	58,94	262,4	9	41,34	190,7	7	49,35	202,2	7
27	30,56	156,6	7	50,88	226,5	9	37,42	172,6	7	43,93	178,0	7
28	50,70	259,7	9	64,79	288,5	9	49,35	227,6	7	53,49	219,2	9
29	19,33	99,0	5	25,2	112,2	7	22,54	104,0	5	26,67	109,3	7
30	19,79	101,4	5	24,88	110,8	5	24,96	115,1	5	27,56	113,0	7
31	18,19	93,2	5	23,27	103,6	5	24,72	114,0	5	27,17	111,4	7
32	36,84	188,7	7	41,17	183,3	7	46,81	215,9	7	50,83	208,3	9
33	18,60	95,3	5	24,07	107,2	5	21,49	99,1	5	26,05	106,7	7

34	21,25	108,9	5	29,38	130,8	7	25,97	119,8	7	31,85	130,5	7
35	24,05	123,2	5	27,38	121,9	7	22,18	102,3	5	26,34	107,9	7
36	6,50	33,3	5	11,61	51,7	5	13,59	58,1	5	18,18	74,5	5
37	31,00	158,8	7	43,75	194,8	7	32,48	149,8	7	37,17	152,3	7
38	25,33	129,8	7	30,24	134,6	7	29,76	137,3	7	35,82	146,8	7
39	23,53	120,5	5	25,00	111,3	5	24,18	111,5	5	28,57	117,1	7
40	19,80	101,4	5	24,44	108,8	5	23,90	110,2	5	26,92	110,3	7
41	6,67	34,2	5	9,73	43,3	5	7,70	35,5	5	9,66	39,6	5

thomonas oryzae

ĐC: Cây lúa C71 không chuyển gen

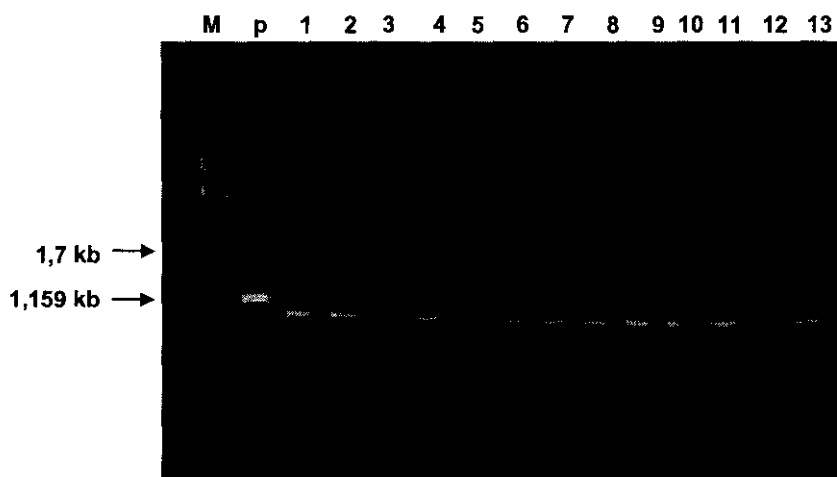
Kết quả đánh giá tình trạng nhiễm bệnh theo thang phân cấp tiêu chuẩn của IRRI trình bày ở bảng 2 cho thấy: cây lúa C71 không chuyển gen đạt điểm 5 (5%-25% lá bị bệnh, nhiễm trung bình) sau 7 ngày và 14 ngày ở cả hai lần lây nhiễm bệnh. Trong khi đó, tất cả 41 dòng cây tái sinh từ các mô sẹo của giống gốc C71 chuyển gen *Xa21* đều đạt mức điểm thể hiện tình trạng nhiễm bệnh là bằng (5 điểm) hoặc cao hơn (từ 7 - 9 điểm) so với cây lúa C71 không chuyển gen ở cả hai lần lây nhiễm bệnh. Tuy nhiên, nếu đánh giá theo % lá bị bệnh thì các dòng 15, 16, 41 có tỷ lệ lá bị bệnh sau 7 ngày và 14 ngày ở cả hai lần lây nhiễm là nhỏ hơn 10%, trong khi đó đối chứng có tỷ lệ lá bị bệnh là 19,52% và 22,46% (tương ứng) ở lần lây nhiễm 1 và ở lần lây nhiễm 2 là 21,68% và 24,4% lá bị bệnh (tương ứng). Ngoài ra, các dòng 5, 8, 9, 10, 13, 17, 18, 21, 22 và 36 cũng có % lá bị bệnh thấp hơn so với cây đối chứng C71 không chuyển gen ở cả hai lần lây nhiễm bệnh, như dòng 8 có tỷ lệ lá bị bệnh là 12,68% và 14,18% sau 7 ngày và 14 ngày (tương ứng) ở lần lây nhiễm 1 và ở lần lây nhiễm 2 là 8,91% và 13,6% lá bị bệnh sau 7 ngày và 14 ngày lây nhiễm bệnh. Trong kết quả của thí nghiệm, chúng tôi cũng thấy có một số dòng cây chuyển gen có mức điểm thể hiện tình trạng nhiễm bệnh là cao hơn so với cây không chuyển gen (như các dòng 1, 2, 3, 6, 7, 19, 24, 26... đều đạt điểm 7 hoặc 9 ở cả 2 lần lây nhiễm bệnh). Điều này có thể là do một số cây tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp có sức sống kém vì phải trải qua thời gian sống trên môi trường có kháng sinh chọn lọc (hygromycine) và kháng sinh diệt khuẩn.

Kết quả của thí nghiệm lây nhiễm bệnh bạc lá đã chỉ ra: trong số 41 dòng cây tái sinh từ các mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21*, đã không có dòng cây nào có mức điểm thể hiện tình trạng nhiễm bệnh là thấp hơn so với cây đối chứng không chuyển gen (đạt từ 1 đến 3 điểm). Tuy nhiên, có 13/41 dòng (các dòng 5, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 36 và 41) là có % lá bị bệnh thấp hơn so với cây C71 không chuyển gen. Để khẳng định sự có mặt hay không của gen *Xa21* trong 13

dòng cây này, cần phải tiến hành phân tích bằng PCR.

iv) Kết quả kiểm tra PCR sự có mặt của gen Xa21

Để xác định các dòng cây có mang đoạn gen *Xa21* hay không, cần phải kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR. Cặp mồi U1 và I1 được sử dụng để nhân bản đặc hiệu đoạn ADN có kích thước 1,4kb trong trình tự của gen *Xa21*.



Hình 72. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra cây chuyển gen

M: marker PstI; p: plasmid mang gen *Xa21* (1,4 kb); 1: cây C71 không chuyển gen; 2 ... 13: cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21*

Từ thí nghiệm đánh giá tính kháng bệnh bạc lá theo thang phân cấp tiêu chuẩn của IRRI, chúng tôi đã chọn được 13/41 dòng cây tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* được xem như có tính kháng bệnh khá so với đối chứng cây chuyển gen để phân tích PCR. Các mẫu ADN của 13 dòng cây đã được dùng làm khuôn để nhân đoạn gen *Xa21* với cặp mồi U1 và I1 bằng kỹ thuật PCR. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của 13 dòng chọn lọc (Hình 72) đã chỉ ra rằng, mẫu ADN plasmid có chứa gen *Xa21* nên đã nhân bản được đoạn ADN với kích thước là 1,4kb, kết quả này hoàn toàn đúng và phù hợp với lý thuyết. Trong khi đó sản phẩm PCR của tất cả 13 dòng chọn lọc đã không có đoạn ADN kích thước 1,4kb được nhân bản mà chỉ có đoạn ADN với kích thước 1,3 kb được nhân bản (không phải gen chuyển). Điều đó chứng tỏ rằng không có một dòng cây nào trong số 13 dòng phân tích đã mang gen *Xa21*.

Sản phẩm PCR của cây C71 đối chứng không chuyển gen cũng có đoạn ADN kích thước 1,3kb. Kết quả nghiên cứu của Liang và CS (1996) chỉ ra có đoạn ADN kích thước 1,3kb được nhân bản ở dòng lúa TP309 không chuyển gen *Xa21* (nhiễm bệnh bạc lá) và có đoạn ADN kích thước 1,4kb được nhân bản trong sản phẩm PCR của dòng 106-17 (IRBB21) chuyển gen *Xa21*. Những cây thế hệ T1 của dòng 106-17 chuyển gen được thử tính kháng bệnh với khuẩn *Xanthomonas*

oryzae ở Philippin, thấy biểu hiện hai kiểu hình: kháng và không kháng (theo tỉ lệ 3:1). Khi tác giả kiểm tra các cây thế hệ T1 của dòng 106-17 bằng PCR thì nhận được kết quả: Những cây thế hệ T1 có kiểu hình kháng trong sản phẩm PCR có đoạn ADN kích thước 1,4kb, còn những cây thế hệ T1 có kiểu hình bị nhiễm bệnh thì trong sản phẩm PCR chỉ có đoạn ADN kích thước 1,3kb. Kết quả phân tích Southern blot cũng chỉ ra sự có mặt của gen *Xa21* trong những dòng cây thế hệ T1 kháng bệnh bạc lá của dòng 106-17 chuyển gen. Khi kiểm tra cây lúa C71 được biến nạp gen *Xa21* với cặp mồi U1 và I1, Hoàng Kim Oanh và CS (1998) cũng nhận được kết quả là có đoạn ADN kích thước 1,3kb được nhân bản trong sản phẩm PCR của cây C71 không mang gen chuyển.

Kết quả phân tích PCR của 13 dòng cây tái sinh từ các mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* bằng kỹ thuật PCR cũng phù hợp với kết quả thử hoạt tính kháng bệnh nhân tạo là không có dòng cây (tái sinh từ mô sẹo chuyển gen) nào có mức điểm thể hiện sự kháng bệnh bạc lá (1 điểm và 3 điểm). Điều đó một lần nữa chứng tỏ rằng chưa có dòng cây nào đã được chuyển gen *Xa21*.

v) Kết quả thử sâu các dòng lúa chuyển gen thế hệ T3, T4

Hạt thế hệ T1, T2, T3, T4 của các dòng cây chuyển gen *cryIA(c)* có kết quả PCR dương tính được đánh giá bioassay (thử bằng sâu đục thân) thu được kết quả sau:

Bảng 39. Kết quả kiểm tra các dòng lúa C71 chuyển gen *cryIA(c)*

STT	Tên Dòng	Thế hệ T1		Thế hệ T2		Thế hệ T3		Thế hệ T4	
		PCR	Biotest	PCR	Biotest	PCR	Biotest	PCR	Biotest
1	C66T1-3		R		S	-	S	+	
2	C66T1-7		R		S	-	S	-	S
3	C66T1-23		R		S	-	S	-	
4	C67T1-4		R		S	-	S	-	S
5	C67T1-11		R		MR	-	MR	+	R
6	1.4/T1-3		R		MR	-	MR	-	
7	1.4/T1-22		R		S	-	S	-	
8	C66T2-27	+	MR		S	-	MR	+	
9	C66T2-18	+	MR		S	-	MR	-	
10	C66T2-25	+	MR		S	-	MR	+	S
11	C66T1-17		MR		S	-	S	+	
12	C67T1-20		MR		S	-	S	-	
13	1.4/T1-13		MR		S	-	S	-	
14	C67T1-3		MR		S	-	S	-	

Ghi chú: R (resistance) Kháng; MR (medium resistance) Kháng trung bình; S (subceptible) Nhiễm
(+) phản ứng PCR dương tính; (-) phản ứng PCR âm tính

Từ bảng trên cho thấy, qua quá trình sàng lọc và đánh giá ở các thế hệ liên tiếp thì thế hệ T3, biotest thu được 5 dòng cây kháng sâu: 1) C67T1-11; 2) 1.4/T1-3; 3) C66T2-25; 4) C66T2-18; 5) C66T2-27.



Hình 73. Một số hình ảnh về sàng lọc và đánh giá cây lúa chuyển gen *cry1A(c)*

A. Thử sâu bằng thân cây lúa nếp hoa vàng (đối chứng nhiễm);

B. Thử sâu bằng thân cây lúa C71 (đối chứng âm)

C. Thử sâu bằng thân cây lúa C71 chuyển gen *Cry1A(c)* ở thế hệ T3 (đối chứng dương)



Hình 74. Kết quả PCR các dòng lúa chuyển gen kháng sâu đục thân thế hệ T4

M) marker 100bp; 1) đối chứng dương; 2) đối chứng âm; 3) C67T4-11; 4) C66T4-25; 5) C66T4-27; 6) C66T4-17; 7) C66T4-3



Hình 75. Dòng C67T4-11 kháng SĐT



Hình 76. Đối chứng C71 không chuyển gen

Thế hệ T4 chúng tôi thu được 5 dòng cây phản ứng PCR dương tính: 1) C66T4-3; 2) C67T4-11; 3) C66T4-25; 4) C66T4-27; 5) C66T4-17 và trong đó có dòng C67T4-11 cho kết quả thử sâu là 100% kháng sâu đục thân sau 3 lần nhắc lại. Những cây

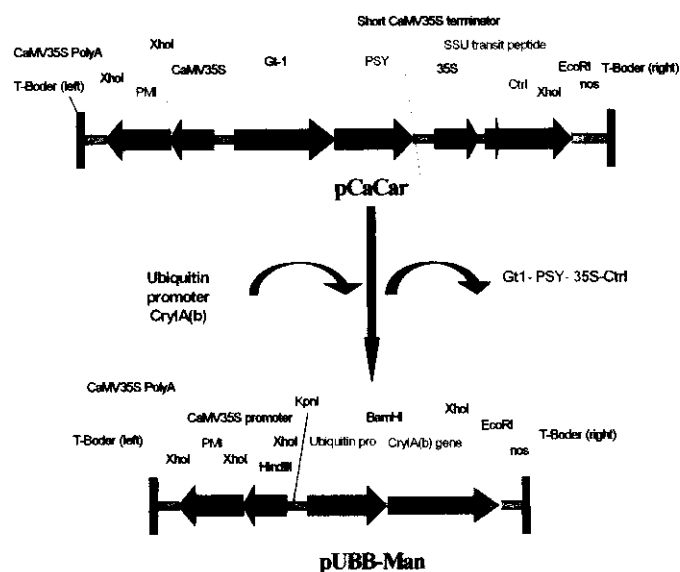
có phản ứng PCR dương tính đang được tiến hành lai Southern và Western.

3.5.3.3. Tạo dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân qua trung gian *A. tumefaciens* và chọn lọc bằng mannose

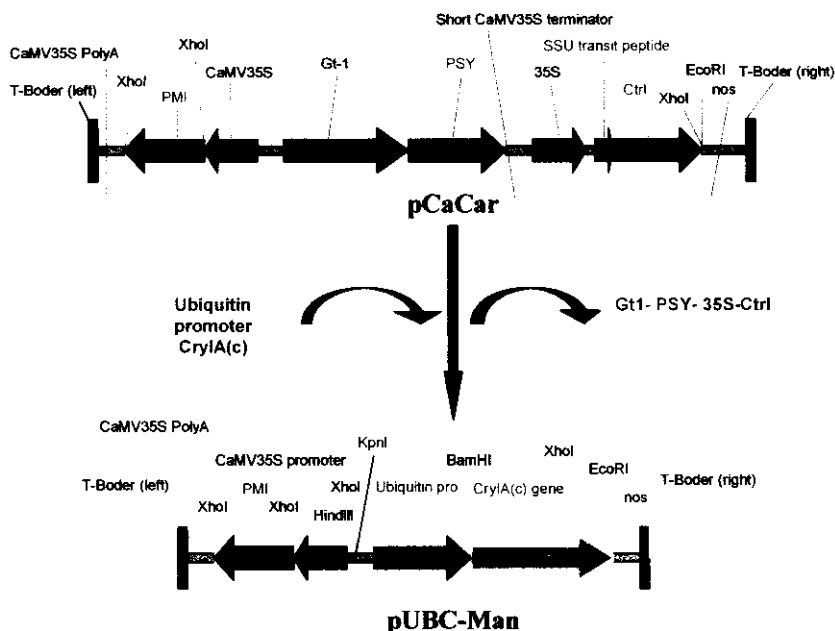
a) Vật liệu và phương pháp

- Thiết kế vector chứa gen kháng sâu *cry1A(b)* và *cry1A(c)* với gen chọn lọc là *pmi*

Để tạo ra các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu bằng hệ thống chọn lọc mannose, chúng tôi đã thiết kế hai vectơ



Hình 77. Sơ đồ vector pUBB-Man



Hình 78. Sơ đồ vector pUBC-Man

Vector pUBB-Man (Hình 75): được thiết kế bằng cách dùng vector pCaCar (Hoa và ctv., 2003) nhưng gen *crtI* và *psy* trên vectơ này được lấy ra bằng enzyme giới hạn *Hind* III + *Bam*HI và thay vào đó là ubiquitin promoter-*cry1A(b)*. Để thực hiện mục tiêu này, ubiquitin-*cry1A(b)* từ vector pUBB (do Dr. Altosaar cung cấp) được tách ra bằng enzyme giới hạn *Hind*III+ *Spe*I và đoạn DNA gần 2,2kb có mang ubiquitin promoter được chọn. Vector pUBB cũng được cắt với *Spe* I+ *Bam*HI để chọn đoạn DNA khoảng 1,9kb có mang gen *cry1A(b)*. Hai đoạn DNA 2,2kb và 1,9kb được gắn đồng thời vào vị trí tương ứng *Hind* III và *Bam*HI trên vector pCaCar. Vector pUBB-Man chuyển vào tế bào có khả năng tiếp nhận DNA ngoại nhập (competent cell) của *A. tumefaciens* chủng LBA 4404 (Hoekema và CS, 1984).

Vector pUBC-Man (Hình 76): được thiết kế bằng cách dùng vectơ pCaCar (Hoa và CS, 2003) nhưng gen *crtI* và *psy* trên vectơ này được lấy ra bằng enzyme giới hạn *Hind* III + *Bam*HI và thay vào đó là ubiquitin-*cry1A(c)* được cắt từ vector pUBC (do Dr. Altosaar cung cấp). Các công đoạn cắt, ghép được thực hiện như trên để tạo ra vector pUBC-Man và được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng LBA 4404 (Hoekema và CS, 1984).

- *Giống lúa và phương pháp chuyển gen*

Phôi non của giống lúa IR64 và phôi già từ hạt gạo KDML105, Một Bụi được tách và nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo. Chọn các mô sẹo có khả năng sinh phôi để chủng với vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng LBA 4404. Phương pháp chuyển gen được thực hiện theo Hoa và Bong (2003). Chọn lọc được tiến hành cách nhau mỗi hai tuần trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có chứa 30 g/l sucrose và 25 g/l mannose (D(+)-mannose 99+%, Heros Organics, Geel, Belgium) ở vòng chọn lọc thứ nhất, 15 g/l sucrose và 25 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ hai và 5 g/l sucrose cộng với 35 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba. Các cây kháng mannose được kiểm tra lại bằng xét nghiệm chlorophenol red (CR) (Hoa và Bong, 2003) trước khi chuyển trồng ra đất.

- *Tách DNA và phân tích Southern*

DNA được trích từ lá theo phương pháp của McCouch và CS (1988). 10 micrograms DNA được cắt đoạn với *Eco*RI và *Bam*HI (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen *cry1A(b)* đối với dòng lúa chuyển gen bằng vectơ pUBB-Man và cắt đoạn với *Kpn*I (một điểm cắt) để xác định số copy. Tương tự DNA của các dòng lúa chuyển gen bằng vector pUBC-Man được cắt đoạn với *Eco*RI và *Bam*HI hoặc *Xho*I (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen *cry1A(c)* và cắt với *Kpn*I (1 điểm cắt) để xác định số copy. DNA cắt đoạn được chạy điện di qua 0,8% agarose

gel trước khi chuyển bằng mao dẫn và cố định trên màng nylon (Hybond-N+, Amersham). Gen *cry1A(b)* và *cry1A(c)* được đánh dấu bằng DIG (Boehringer, Rotkreuz, Switzerl) được dùng làm mẫu dò lai (probe). Lai, rửa, phát hiện và xác định gen được thực hiện theo phương pháp của Wiinn và ctv. (1996).

- Phân tích sự phân ly của các dòng lúa biến đổi gen

Hạt tự thụ T₁ từ các cây lúa biến đổi gen To được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS + 20g/l mannose. Các cây kháng phát triển trên môi trường sau 2 tuần được chuyển trồng trên đất trong nhà lưới. Mẫu lá được lấy để phân tích Southern.

*- Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scirpophaga incertulas* của các dòng lúa biến đổi gen Bt*

*** Vật liệu**

- Giống chuẩn kháng W1263, IR 62 và chuẩn nhiễm IR29.
- Các dòng lúa chuyển gen *Bt* ở thế hệ T₁ và T₃.
- Vợt bắt bướm, bóng đèn điện, lồng nhựa lớn để nuôi bướm lấy trứng.
- khay lớn. Lồng nhựa nhỏ dùng trong thử nghiệm.
- Hộp nhựa (= 6cm) để ủ trứng nở, cọ nhỏ dùng bắt sâu non.
- Chậu sành (= 15cm) trồng các dòng giống lúa cần thử nghiệm.
- Phân bón cho lúa thử nghiệm .

*** Phương pháp trồng lúa và nuôi sâu**

Các dòng lúa thử nghiệm được trồng trong chậu nhựa nhỏ đường kính 15cm, 3 chậu/dòng, cấy ở tuổi mạ 15 ngày và thử nghiệm ở giai đoạn 30 ngày sau khi cấy (Hình 77). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại trong 3 khay tôn kích thước 1,2 x 2,4 x 0,2m.

Bướm sâu đục thân được bắt vào buổi tối dưới bóng đèn điện bằng ống nghiệm. Bướm được nuôi cho đẻ trứng trong lồng nhựa có đặt sẵn lúa 30 ngày tuổi. Bướm đẻ trứng sau 1 - 2 ngày và nở sau 5 - 7 ngày. Lá có ổ trứng được thu cho vào hộp nhựa có lót giấy thấm ủ 2 ngày trước khi trứng nở.



Hình 79. Trồng các dòng lúa thử nghiệm

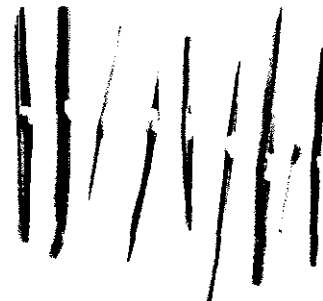
Quy trình nuôi sâu được trình bày từ hình 78a-e.



Hình 80a. Bướm sâu đục thân hai chấm được nuôi trong nhà lưới



Hình 80b. Lồng nuôi bướm sâu đục thân



Hình 80c. Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi



Hình 80d. Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi



Hình 80e. Sâu đục thân nở (sau 7 ngày tạo ra sâu con)

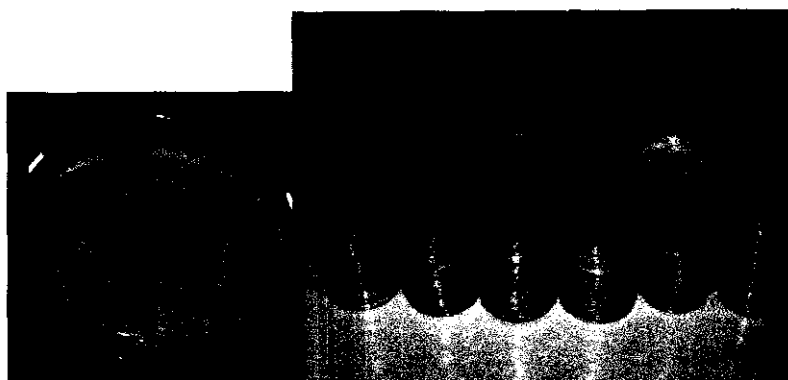
* Phương pháp thử nghiệm đĩa petri

- Cắt đoạn thân (7cm) cho vào đĩa petri có lót giấy lọc ẩm (3 lần lặp lại cho mỗi dòng).
- Thả 5 sâu mới nở vào mỗi đĩa, dán kín bằng parafilm để tránh sự thất thoát sâu (Hình 79a).

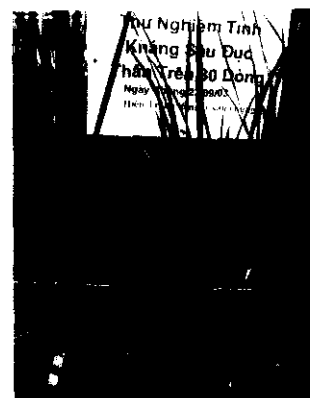
- Cho đĩa petri vào phòng có nhiệt độ 25°C.
- Tách thân lúa để quan sát số sâu sống, chết hoặc thất thoát sau 4 ngày lây nhiễm.

*** Phương pháp thử nghiệm toàn cây**

Cây được chọn 10 chồi, 3 lần lặp lại cho mỗi dòng. Mỗi cây được chủng với 10 con sâu mới nở, 1 sâu/chồi và được cho vào lồng để tránh sâu thoát.



Hình 81a. Thử nghiệm tính kháng trong đĩa petri



Hình 81b. Thử nghiệm tính kháng toàn cây

Chỉ tiêu theo dõi gồm:

- Đếm số chồi héo do sâu đục vào các ngày : 5,10,15 và 20 sau khi thả sâu. Tính tỷ lệ héo đột (Hình 79b).
- Tính tỷ lệ sâu sống trên mỗi dòng vào ngày thứ 25 sau chủng sâu bằng cách: Cắt sát gốc cây lúa thử nghiệm để dễ tách đếm sâu sống hay nhộng trên mỗi dòng, giống.
- Cân trọng lượng sâu ngay sau khi đếm sâu sống của từng dòng với 3 lần nhắc lại (3 chậu).
- Cấp hại của sâu đục thân trên các dòng thử nghiệm được đánh giá theo thang điểm (IRRI) dựa trên tỷ lệ chồi chết như sau:

Bảng 40. Cấp hại của sâu đục thân

Tỷ lệ chết đột	Cấp	Phản ứng
0%	0	Rất kháng (RK)
1 - 10%	1	Kháng (K)
11 - 20%	3	Hơi kháng (HK)
21 - 30%	5	Hơi nhiễm (HN)
31 - 60%	7	Nhiễm (N)
> 60%	9	Rất nhiễm (RN)

b) Kết quả chuyển gen kháng sâu đục thân vào lúa**- Tạo các dòng lúa biến đổi gen *cry1A(b)* và *cry1A(c)***

Các giống lúa được dùng để chuyển gen bằng phương pháp sử dụng *Agrobacterium* gồm IR64, KDML105 và Một Bụi, đây là các giống lúa thuộc nhóm *indica*, phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Vector mang gen kháng sâu *cry1A(b)* hoặc *cry1A(c)* và gen chỉ thị *pmi* cho phép áp dụng hệ thống chọn lọc mannose đã được thiết kế và chuyển gen vào các giống lúa trên.

Bảng 41. Hiệu quả biến đổi gen bằng *A. tumefaciens* LBA 4404 (pUBB-Man)

Giống	Thí nghiệm	Số mô sẹo tạo phôi được chủng (A)	Số mô kháng	Số cây xanh tái sinh	Cây biến đổi gen (kiểm chứng bằng CR+ và Southern blot+) (B)	Hiệu quả biến đổi gen (B/A)%
IR64	1	125	15	6	3	2,40
	2	140	10	5	2	1,42
	3	100	6	3	1	1,00
KDML105	1	120	16	7	3	2,50
	2	150	12	8	5	3,33
	3	146	4	2	1	0,79
Một Bụi	1	109	10	7	6	5,50
	2	120	10	8	7	5,83

Hiệu quả biến đổi gen đối với vectơ pUBB-Man trên giống IR64 từ 1,00 - 2,40% và KDML105 từ 0,79 - 3,33%, Một Bụi 5,50 - 5,80% (Bảng 38) đối với vector pUBC-Man trên giống IR 64 từ 1,80 - 4,78% và KDML105 từ 1,81 - 3,07% và Một Bụi 4,16 - 5,71% (Bảng 38). Aldermita và Hodges (1996) thực hiện chuyển gen trên giống IR64 bằng *Agrobacterium* và chọn lọc bằng hygromycin, thu nhận hiệu quả biến đổi thấp hơn hiệu quả đạt được ở nghiên cứu này. Chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens* và chọn lọc bằng đường mannose đối với các giống lúa *indica* cho hiệu quả chuyển gen cao. Trong nghiên cứu này của chúng tôi sử dụng 5g/l sucrose cộng với 35g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba. Hoa và CS (2003) báo cáo đã dùng 5g/l sucrose cộng với 50g/l mannose ở lần chọn lọc thứ ba cho giống Taipei 309. Nồng độ mannose cần cho chọn lọc đối với giống *indica* thấp hơn *japonica*.

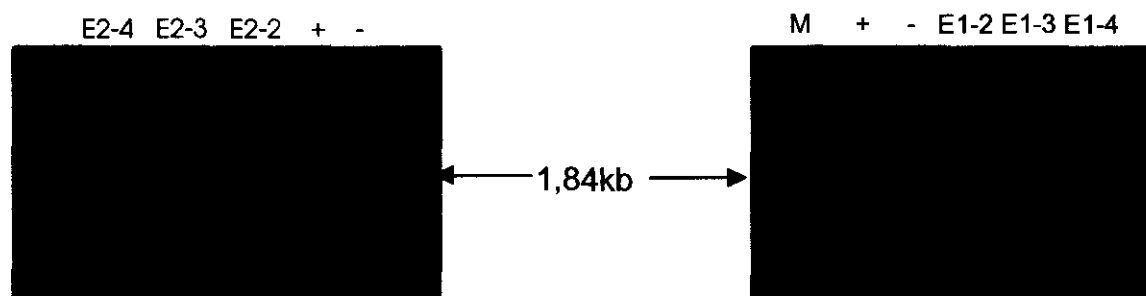
Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy chọn lọc bằng mannose cho hiệu quả chuyển gen tương đối cao, các cây phát triển trên môi trường mannose được kiểm định có mang gen *pmi* qua xét nghiệm PCR và phân tích Southern. Kết quả đã thu được các dòng T0 mang gen *cry1A(c)* và *cry1A(b)* được kiểm định bằng phân tích Southern (Hình 80A & B, 81). Các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đang được tạo

ra bằng ứng dụng hệ thống chọn lọc mannose, sinh trưởng phát triển bình thường (Hình 82 và 83). Nghiên cứu này cũng cho thấy lợi điểm của phương pháp biến đổi gen bằng *Agrobacterium*. Gen chuyển được gắn vào bộ gen cây lúa theo phương thức đơn giản ở một locus, không có sự tái sắp xếp, điều này liên quan đến tính ổn định trong sự biểu hiện của gen chuyển ở các dòng biến đổi gen.

Để phân tích sự phân ly của các dòng biến đổi gen, hạt tự thụ của các cây biến đổi gen (thế hệ T₁) được cấy trong môi trường 1/2 MS có 20g/l mannose. Cây kháng được đánh giá sau 2 tuần nuôi cấy và được chuyển vào trồng nhà lưới để lấy mẫu phân tích Southern. Sự phân ly các dòng T₁ trên môi trường chọn lọc có chứa mannose theo tỷ lệ 3 kháng: 1 nhiễm theo định luật Mendel trong trường hợp gen được chuyển gắn vào nhiễm sắc thể một cách đơn giản (Bảng 42).

Bảng 42. Hiệu quả biến đổi gen bằng *A. tumefaciens* LBA 4404 (pUBC-Man)

Giống	Thí nghiệm	Số mô sẹo tạo phôi được chủng (A)	Số mô kháng	Số cây xanh tái sinh	Cây biến đổi gen (kiểm chứng bằng CR+ và Southern blot+) (B)	Hiệu quả biến đổi gen (B/A)%
IR64	1	230	60	25	11	4,78
	2	110	10	5	2	1,80
	3	100	9	4	2	2,00
KDML105	1	110	15	7	2	1,81
	2	130	16	9	4	3,07
	3	146	14	6	3	2,05
Một Bụi	1	120	10	8	5	4,16
	2	140	16	12	8	5,71



Hình A

Hình B

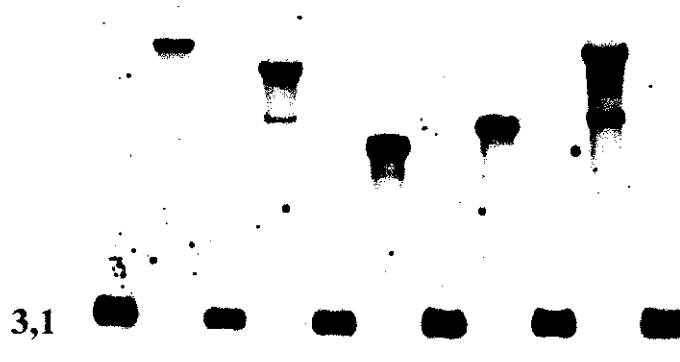
Hình 82. Phân tích Southern blot các dòng T₀/ IR64 chuyển gen với plasmid

A. Phân tích Southern blot các dòng T₀/ IR64 chuyển gen với plasmid pUBC-Man bằng *Agrobacterium*. DNA được cắt đoạn bằng *Bam*H I cộng *Eco*R I. Màng được lai với đoạn gen *cry*1A(c) phương pháp đánh dấu DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 1,84kb của gen *cry*1A(c). (-): Đối chứng không biến đổi gen. (+): Plasmid DNA.

B. Phân tích Southern blot các dòng lúa T₀/IR64 chuyển gen bởi plasmid pUBB-Man bằng *Agrobacterium*.

DNA được cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*H I và *Eco*R I. Màng được lai với đoạn gen *cry*1A(b) phương pháp đánh dấu DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 1,84kb của gen *cry*1A(b). (+): Plasmid DNA; (-): Đối chứng không chuyển gen

M - +
(kb) E1-2 E1-3 E1-6 E2-3 E2-4
 S D S D S D S D S D

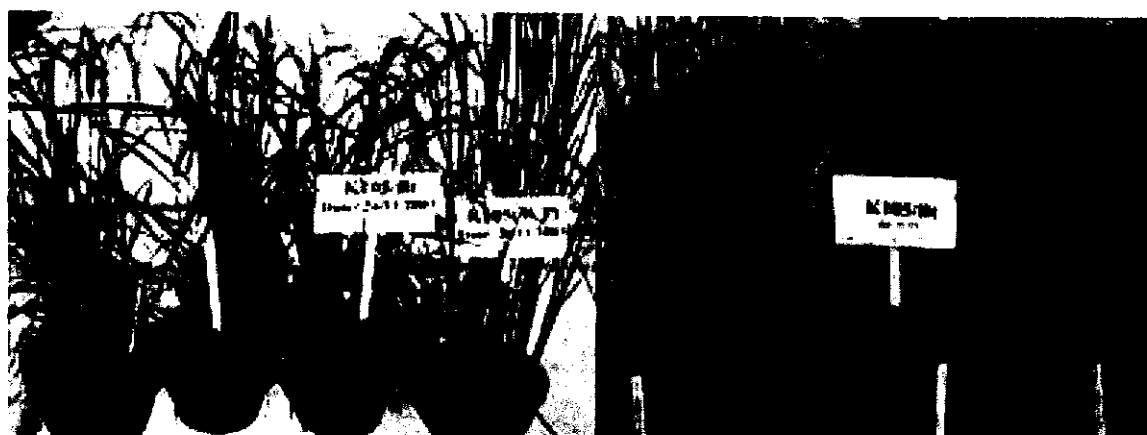


Hình 83. Phân tích Southern của các dòng lúa Một bụi (T_0) chuyển gen với pUBC-Man

S: cắt đơn bởi *KpnI*, D: cắt đôi bởi *XhoI*. -: đối chứng 1. +: Plasmid DNA



Hình 84. Cây chuyển gen thế hệ T_2 giống IR64 trồng tại nhà lưới Viện lúa ĐBSCL



Hình 85. Cây chuyển gen thế hệ T_2 giống KDML105 trồng tại nhà lưới Viện lúa ĐBSCL

Bảng 43. Đánh giá sự phân ly của các cây chuyển gen qua chọn lọc mannose

Thế hệ	Gen được chuyển	Dòng (IR64)	Tổng số hạt chọn lọc	Chọn lọc Mannose		Tỷ lệ phân ly (Kháng: Nhiễm)
				Kháng	Nhiễm	
T1	cry1A(b)	E1-2/cry1A(b)	30	13	17	13:17
		E1-3/cry1A(b)	30	16	14	16:14
	cry1A(c)	E2-1/cry1A(c)	40	24	16	24:16
		E2-2/cry1A(c)	40	23	17	23:17
		E2-3/cry1A(c)	30	24	6	24:6
		E2-4/cry1A(c)	31	20	11	20:11
		E2-5/cry1A(c)	30	24	6	24:6
		E2-6/cry1A(c)	30	12	18	12:18
		E2-9/cry1A(c)	30	18	12	18:12
		E2-11/cry1A(c)	30	20	10	20:10
		E2-12/cry1A(c)	31	17	14	17:14
		E2-13/cry1A(c)	29	18	11	18:11
		E2-14/cry1A(c)	30	22	8	22:8
		E2-15/cry1A(c)	30	22	8	22:8
		E2-16/cry1A(c)	30	13	17	13:17
		E2-17/cry1A(c)	29	20	9	20:9
		E2-18/cry1A(c)	29	18	11	18:11
T2	cry1Ab	E1-2-4/cry1A(b)	7	4	3	4:3
		E1-3-7/cry1A(b)	10	7	3	7:3
		E1-3-9/cry1A(b)	41	30	11	30:11
		E1-3-10/cry1A(b)	40	31	9	31:9
	cry1A(c)	E2-1-1/cry1A(c)	27	37	0	37:0
		E2-1-2/cry1A(c)	40	40	0	40:0
		E2-1-3/cry1A(c)	39	39	0	39:0
		E2-1-4/cry1A(c)	36	36	0	36:0
		E2-1-5/cry1A(c)	40	30	10	30:10
	cry1A(c)	E2-2-1/cry1A(c)	20	16	4	16:4
		E2-2-2/cry1A(c)	19	15	4	15:4
		E2-2-3/cry1A(c)	20	20	0	20:0
		E2-2-4/cry1A(c)	20	14	6	14:6
		E2-2-5/cry1A(c)	21	14	7	14:7
		E2-2-6/cry1A(c)	20	15	5	15:5
		E2-2-7/cry1A(c)	22	10	12	10:12
		E2-2-8/cry1A(c)	20	12	8	12:8
		E2-2-9/cry1A(c)	20	17	3	17:3
	cry1A(c)	E2-3-1/cry1A(c)	40	30	10	30:10
		E2-3-2/cry1A(c)	40	29	11	29:11
		E2-3-3/cry1A(c)	40	35	5	35:5
		E2-3-4/cry1A(c)	40	30	10	40:10
	cry1A(c)	E2-4-1/cry1A(c)	22	18	4	18:4
		E2-4-2/cry1A(c)	20	16	5	16:5
		E2-4-3/cry1A(c)	21	16	5	16:5
		E2-4-4/cry1A(c)	20	18	2	18:2
		E2-4-5/cry1A(c)	20	18	2	18:2
		E2-4-7/cry1A(c)	20	20	0	20:0
	cry1A(c)	E2-5-1/cry1A(c)	13	10	3	10:3
		E2-5-2/cry1A(c)	20	8	12	8:12
		E2-5-4/cry1A(c)	21	12	9	12:9

		E2-5-5/cry1A(c)	20	14	6	14:6
		E2-5-6/cry1A(c)	20	16	4	16:4
	cry1A(c)	E2-6-1/cry1A(c)	8	5	3	5:3
	cry1A(c)	E2-9-1/cry1A(c)	40	30	10	30:10
		E2-9-2/cry1A(c)	40	29	11	29:11
		E2-9-3/cry1A(c)	43	34	6	34:6
		E2-9-5/cry1A(c)	37	37	0	37:0
	cry1A(c)	E2-11-1/cry1A(c)	38	29	9	29:9
		E2-11-2/cry1A(c)	40	32	8	32:8
		E2-11-4/cry1A(c)	40	27	13	27:13
	cry1A(c)	E2-12-1/cry1A(c)	39	28	11	28:11
		E2-12-3/cry1A(c)	39	36	3	36:3
		E2-12-4/cry1A(c)	40	31	9	31:9
		E2-12-5/cry1A(c)	40	28	12	28:12
		E2-12-7/cry1A(c)	40	26	14	26:14
		E2-12-8/cry1A(c)	40	30	10	30:10
		E2-12-9/cry1A(c)	40	26	14	26:14
		E2-12-10/cry1A(c)	39	25	14	25:14
	cry1A(c)	E2-13-1/cry1A(c)	40	32	8	32:8
		E2-13-2/cry1A(c)	38	38	0	38:0
		E2-13-3/cry1A(c)	40	23	17	23:17
		E2-13-4/cry1A(c)	40	39	1	39:1
		E2-13-5/cry1A(c)	40	40	0	40:0
		E2-13-7/cry1A(c)	36	36	0	36:0
		E2-13-8/cry1A(c)	40	24	16	24:16
		E2-13-9/cry1A(c)	40	38	2	38:2
	cry1A(c)	E2-15-4/cry1A(c)	40	38	2	38:2
		E2-15-5/cry1A(c)	40	40	0	40:0
		E2-15-6/cry1A(c)	40	39	1	39:1
		E2-15-7/cry1A(c)	40	31	9	31:9
		E2-15-8/cry1A(c)	39	37	02	37:2
	cry1A(c)	E2-16-1/cry1A(c)	39	28	11	28:11
		E2-16-2/cry1A(c)	40	26	14	26:14
		E2-16-3/cry1A(c)	39	24	15	24:15
		E2-16-5/cry1A(c)	38	28	10	28:10
		E2-16-6/cry1A(c)	40	26	14	26:14
		E2-16-7/cry1A(c)	18	10	8	10:9
		E2-16-8/cry1A(c)	41	27	14	27:14
		E2-16-9/cry1A(c)	40	32	8	32:8
	cry1A(c)	E2-18-1/cry1A(c)	40	37	3	37:3
		E2-18-2/cry1A(c)	40	39	1	39:1
		E2-18-6/cry1A(c)	40	31	9	31:9
		E2-18-7/cry1A(c)	41	32	9	32:9
		E2-18-8/cry1A(c)	10	6	4	6:4

- Kết quả thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân của các dòng biến đổi gen Bt

* Thử nghiệm tính kháng toàn cây các dòng biến đổi gen T₁ (IR64)

Tính kháng (thử nghiệm toàn cây) của 30 dòng biến đổi gen (thế hệ T₁) được thử nghiệm trong nhà lưới. W1263 được dùng làm giống chuẩn kháng, IR29 làm

giống chuẩn nhiễm.

Kết quả trình bày ở Bảng 44 cho thấy tỷ lệ chồi héo ở 5, 10, 15, 20 ngày sau khi chủng sâu. Ở 20 ngày giống chuẩn kháng W1263 có số chồi héo là 37,59%, giống chuẩn nhiễm IR29 có tỷ lệ 61,12%, trong khi có 11/13 dòng dòng biến đổi gen T₁ có tỷ lệ chồi héo thấp hơn 10%. Các dòng có tỷ lệ chồi héo thấp nhất gồm dòng số 29: E2-5-6/cry1Ac (1,66%), dòng số 1 E2-1-1/cry1Ac (2,88%), dòng số 16: E2-3-2/cry1Ac (4,62%).

Bảng 44. Tỷ lệ chồi héo (%) ghi nhận trên 30 dòng giống lúa IR64 ở thế hệ T₁ ở 5, 10, 15, 20 ngày sau khi chủng sâu

TT	Dòng	5 ngày sau chủng sâu	10 ngày sau chủng sâu	15 ngày sau chủng sâu	20 ngày sau chủng sâu
1	E2-1-1/cry1A(c)	0	5,54 ab	2,56 a	2,88 a
2	E2-1-2/cry1A(c)	9,44 ab	2,78 a	5,55 abc	7,50 abc
3	E2-1-3/cry1A(c)	0	9,44 a-d	3,33 ab	5,46 ab
4	E2-1-4/cry1A(c)	2,56 a	12,72 a-d	3,03 ab	10,31 abc
5	E2-1-5/cry1A(c)	5,55 a	3,33 a	3,03 ab	5,34 ab
6	E2-2-1/cry1A(c)	7,48 a	10,43 a-d	11,18 a-e	13,38 a-e
7	E2-2-2/cry1A(c)	6,36 a	6,66 abc	14,08 a-f	13,06 a-e
8	E2-2-3/cry1A(c)	3,83 a	9,33 a-d	6,36 a-d	6,82 ab
9	E2-2-4/cry1A(c)	6,86 a	10,00 a-d	8,09 a-e	6,94 ab
10	E2-2-5/cry1A(c)	8,46 a	11,42 a-d	17,26 a-f	16,38 a-f
11	E2-2-6/cry1A(c)	10,43 ab	12,22 a-d	22,77 c-f	22,08 b-h
12	E2-2-7/cry1A(c)	5,55 a	24,28 d	24,99 ef	19,72 a-g
13	E2-2-8/cry1A(c)	4,75 a	8,92 a-d	13,88 a-f	7,50 abc
14	E2-2-9/cry1A(c)	4,76 a	4,76 a	3,33 ab	4,99 ab
15	E2-3-1/cry1A(c)	0	8,33 a-d	11,66 a-e	13,03 a-d
16	E2-3-2/cry1A(c)	13,89 ab	12,96 a-d	9,69 a-e	4,62 ab
17	E2-3-3/cry1A(c)	6,11 a	11,38 a-d	13,96 a-f	12,79 a-d
18	E2-3-4/cry1A(c)	3,38 a	0	9,97 a-e	11,50 abc
19	E2-4-1/cry1A(c)	7,83 a	9,69 a-d	20,50 b-f	25,79 c-l
20	E2-4-2/cry1A(c)	8,14 a	10,18 a-d	18,75 a-f	35,77 ghi
21	E2-4-3/cry1A(c)	5,12 a	21,39 bcd	30,74 fg	30,95 e-l
22	E2-4-4/cry1A(c)	8,21 a	13,89 a-d	21,49 c-f	33,39 f-i
23	E2-4-5/cry1A(c)	6,88 a	12,53 a-d	21,61 c-f	30,42 d-i
24	E2-4-7/cry1A(c)	12,75 ab	10,53 a-d	6,36 a-d	5,34 ab
25	E2-5-1/cry1A(c)	2,77 a	5,88 abc	12,28 a-e	12,39 abc
26	E2-5-2/cry1A(c)	2,77 a	3,83 a	6,86 a-d	9,82 abc
27	E2-5-4/cry1A(c)	0	3,33 a	17,18 a-f	14,99 a-e
28	E2-5-5/cry1A(c)	0	2,77 a	11,77 a-e	12,15 abc
29	E2-5-6/cry1A(c)	5,55 a	5,55 ab	2,56 a	1,66 a
30	E2-6-1/cry1A(c)	22,22 b	22,85 cd	44,24 g	42,78 i
31	IR29 (Chuẩn nhiễm)	22,42 b	47,98 e	61,57 h	61,12 j
32	CK W1263 (Chuẩn kháng)	9,87 ab	14,96 a-d	23,27 def	37,59 hi
	CV%	93,7	67,5	58,4	55,5

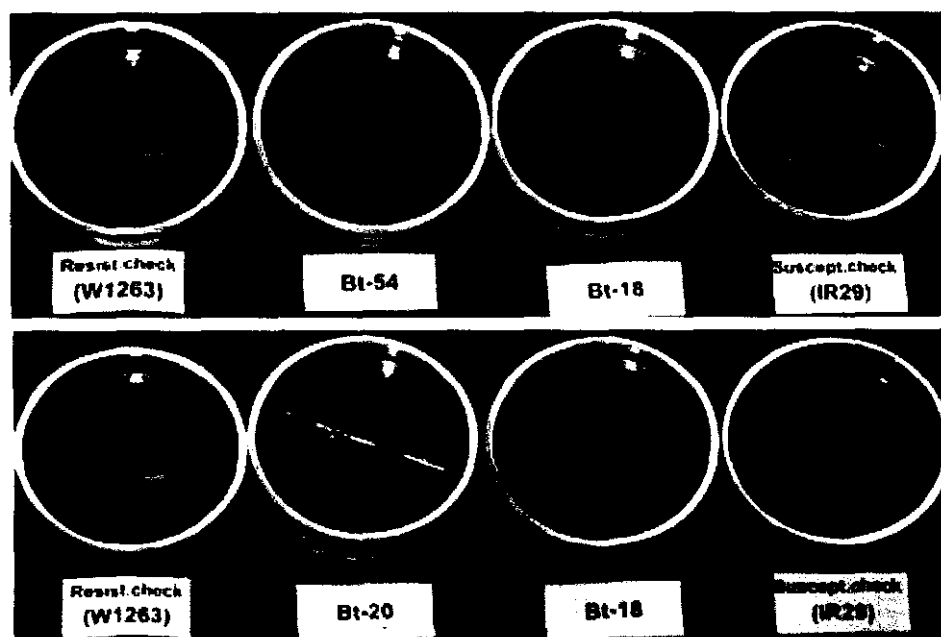
Bảng 44 ghi nhận tỷ lệ sâu còn sống và trọng lượng sâu sống trên các dòng thử nghiệm ở 25 ngày sau khi chủng sâu. Tỷ lệ sâu sống sót và trọng lượng sâu

sống trên giống chuẩn kháng W1263 lần lượt là 4,87 và 0,02 gram, trên giống chuẩn nhiễm IR29 lần lượt là 8,88 và 0,07 gram. Kết quả ghi nhận 16/30 dòng biến đổi gen T₁ không có sâu sống (tỷ lệ sống 0%).

Bảng 45 cho thấy sự khác biệt về sâu sống sót giữa dòng biến đổi gen so với giống chuẩn nhiễm, chuẩn kháng.

Bảng 45. Tỷ lệ sâu sống (%) và trọng lượng sâu sống 25 ngày sau chủng

TT	Dòng	Số sâu thả (con)	Tỷ lệ sâu sống (%)	Trọng lượng sâu sống (gram)
1	E2-1-1/cry1A(c)	34	0	0
2	E2-1-2/cry1A(c)	28	0	0
3	E2-1-3/cry1A(c)	35	0	0
4	E2-1-4/cry1A(c)	32	0	0
5	E2-1-5/cry1A(c)	31	0	0
6	E2-2-1/cry1A(c)	33	0	0
7	E2-2-2/cry1A(c)	35	2,85	0,01
8	E2-2-3/cry1A(c)	31	0	0
9	E2-2-4/cry1A(c)	30	0	0
10	E2-2-5/cry1A(c)	31	0	0
11	E2-2-6/cry1A(c)	32	0	0
12	E2-2-7/cry1A(c)	17	0	0
13	E2-2-8/cry1A(c)	23	8,69	0,02
14	E2-2-9/cry1A(c)	24	0	0
15	E2-3-1/cry1A(c)	26	7,69	0,04
16	E2-3-2/cry1A(c)	31	6,45	0,03
17	E2-3-3/cry1A(c)	33	0	0
18	E2-3-4/cry1A(c)	31	0	0
19	E2-4-1/cry1A(c)	29	10,34	0,06
20	E2-4-2/cry1A(c)	41	14,63	0,10
21	E2-4-3/cry1A(c)	31	9,67	0,04
22	E2-4-4/cry1A(c)	39	15,38	0,09
23	E2-4-5/cry1A(c)	35	0	0
24	E2-4-7/cry1A(c)	31	6,45	0,09
25	E2-5-1/cry1A(c)	35	8,57	0,04
26	E2-5-2/cry1A(c)	31	3,22	0,02
27	E2-5-4/cry1A(c)	34	5,88	0,02
28	E2-5-5/cry1A(c)	35	11,42	0,05
29	E2-5-6/cry1A(c)	36	0	0
30	E2-6-1/cry1A(c)	32	28,12	0,12
31	IR29 (Chuẩn nhiễm)	45	8,88	0,07
32	W1263 (Chuẩn kháng)	41	4,87	0,02



Hình 86. Sâu sống sót trên các dòng lúa thử nghiệm

Bảng 46. Cấp hại (0-9) và phản ứng của các dòng lúa thử nghiệm đối với sâu đục thân

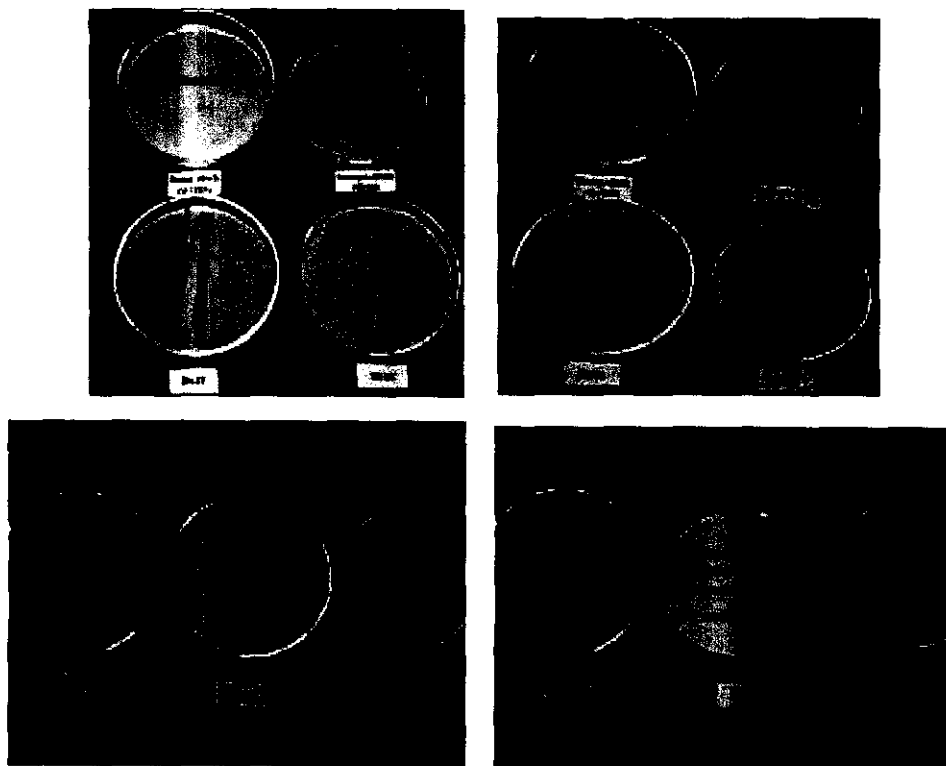
TT	Dòng	Cấp hại trung bình	Phản ứng
1	E2-1-1/cry1A(c)	1	K
2	E2-1-2/cry1A(c)	1	K
3	E2-1-3/cry1A(c)	1	K
4	E2-1-4/cry1A(c)	1	K
5	E2-1-5/cry1A(c)	1	K
6	E2-2-1/cry1A(c)	3	HK
7	E2-2-2/cry1A(c)	3	HK
8	E2-2-3/cry1A(c)	1	K
9	E2-2-4/cry1A(c)	1	K
10	E2-2-5/cry1A(c)	3	HK
11	E2-2-6/cry1A(c)	5	HN
12	E2-2-7/cry1A(c)	3	HK
13	E2-2-8/cry1A(c)	1	K
14	E2-2-9/cry1A(c)	1	K
15	E2-3-1/cry1A(c)	3	HK
16	E2-3-2/cry1A(c)	1	K
17	E2-3-3/cry1A(c)	3	HK
18	E2-3-4/cry1A(c)	3	HK
19	E2-4-1/cry1A(c)	5	HN
20	E2-4-2/cry1A(c)	7	N
21	E2-4-3/cry1A(c)	7	N
22	E2-4-4/cry1A(c)	7	N
23	E2-4-5/cry1A(c)	5	HN
24	E2-4-7/cry1A(c)	1	K
25	E2-5-1/cry1A(c)	3	HK
26	E2-5-2/cry1A(c)	1	K
27	E2-5-4/cry1A(c)	3	HK
28	E2-5-5/cry1A(c)	3	HK
29	E2-5-6/cry1A(c)	1	K
30	E2-6-1/cry1A(c)	7	N
31	IR29 (chuẩn nhiễm)	7	RN
32	W1263 (chuẩn kháng)	5	N

Đánh giá tính kháng của các dòng lúa thử nghiệm theo thang điểm 0 - 9 dựa trên tỷ lệ số chồi chết vào 20 ngày sau khi chủng sâu được trình bày ở Bảng 42. Kết quả ghi nhận giống chuẩn kháng W1263 có cấp 5 (hơi nhiễm), giống chuẩn nhiễm IR29 có cấp 7 (nhiễm). Trong 30 dòng biến đổi gen T_1 sự phân bố tính kháng như sau:

- Cấp 0 (rất kháng): không có dòng nào.
- Cấp 1 (kháng): 13 dòng chiếm 43,3 %
- Cấp 3 (hơi kháng): 10 dòng chiếm 33,3 %
- Cấp 5 (hơi nhiễm): 3 dòng chiếm tỷ lệ 10,0 %
- Cấp 7 (nhiễm): 4 dòng chiếm tỷ lệ 13,3 %

Kết quả này cho thấy, sự biểu hiện gen *Bt* (*cry1A(c)*) rất hiệu quả trong tạo ra tính kháng sâu đục thân ở lúa, số dòng biến đổi gen cho tính kháng cao (cấp 1) chiếm tỷ lệ đến 43,3%.

*** Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân các dòng lúa biến đổi gen T_2**



Hình 87. Các dòng lúa thử nghiệm được thử sâu 5 sâu mới nở/đoạn thân/3 lần lặp lại và tách thân để quan sát sâu sau 5 ngày

Các dòng thể hiện độc tính Bt cao (Bt33: E2-16-8-7/*cry1A(c)*, Bt 37: E2-18-7-4/*cry1A(c)*, Bt 30: E2-16-5-7/*cry1A(c)*, Bt 22: E2-13-8-4/*cry1A(c)*, Bt 28: E2-16-2-6/*cry1A(c)*) cho thấy sâu chết hoàn toàn sau 5 ngày lây nhiễm trong khi có 50% sâu chết ở giống chuẩn kháng (W1263) và không có sâu chết ở dòng chuẩn nhiễm (IR29).

Các dòng lúa biến đổi gen thế hệ T_2 được thử nghiệm với phương pháp đĩa petri cùng với giống chuẩn kháng W1263 và chuẩn nhiễm IR29. Số liệu được ghi nhận cho số sâu sống, số sâu chết và tỷ lệ sâu chết. Hình 84 cho thấy sự khác biệt số sâu sống trên dòng biến đổi gen (100% chết) và giống chuẩn nhiễm, chuẩn kháng.

Kết quả được trình bày ở Bảng 43 cho thấy giống chuẩn kháng W1236 có tỷ lệ sâu chết 7/14 (50%), giống chuẩn nhiễm IR29 có 0/14 (0%). Trong 37 dòng lúa biến đổi gen, có đến 27 dòng có tỷ lệ sâu chết 100%, 7 dòng có tỷ lệ sâu chết trên 50%, 3 dòng có tỷ lệ sâu chết <50%. Các dòng cho tỷ lệ sâu chết 100% đều mang gen *cry1A(c)*. Một dòng mang gen *cry1A(b)* cho tỷ lệ sâu chết thấp (6,67%). Điều này cho thấy gen *cry1A(c)* hoạt động có hiệu quả tạo tính kháng sâu đục thân ở lúa.

Bảng 47. Số sâu sống, sâu chết và tỷ lệ sâu chết trên các dòng lúa thử nghiệm

STT	Dòng	Ký hiệu dòng	Số sâu đếm được 5 ngày sau khi chủng			Tỷ lệ con chết (%)
			Tổng số con	Số con sống	Số con chết	
1	E2-11-1-1/ CryIA(c)	7	14	0	14	100.00
2	E2-11-2-7/ CryIA(c)	8	13	0	13	100.00
3	E2-11-4-4/ CryIA(c)	9	12	0	12	100.00
4	E2-12-1-1/ CryIA(c)	10	14	0	14	100.00
5	E2-12-3-4/ CryIA(c)	11	15	0	15	100.00
6	E2-12-5-3/ CryIA(c)	12	9	0	9	100.00
7	E2-12-7-7/ CryIA(c)	13	15	0	15	100.00
8	E2-12-8-5/ CryIA(c)	14	10	0	10	100.00
9	E2-12-9-5/ CryIA(c)	15	12	0	12	100.00
10	E2-12-10-7/ CryIA(c)	16	12	0	12	100.00
11	E2-13-1-8/ CryIA(c)	17	11	0	11	100.00
12	E2-13-8-4/ CryIA(c)	22	13	0	13	100.00
13	E2-15-6-7/ CryIA(c)	24	14	0	14	100.00
14	E2-15-7-2/ CryIA(c)	25	15	0	15	100.00
15	E2-15-8-4/ CryIA(c)	26	15	0	15	100.00
16	E2-16-1-1/ CryIA(c)	27	14	0	14	100.00
17	E2-16-2-6/ CryIA(c)	28	13	0	13	100.00
18	E2-16-3-3/ CryIA(c)	29	14	0	14	100.00
19	E2-16-5-7/ CryIA(c)	30	14	0	14	100.00
20	E2-16-6-1/ CryIA(c)	31	12	0	12	100.00
21	E2-16-7-5/ CryIA(c)	32	14	0	14	100.00
22	E2-16-8-7/ CryIA(c)	33	13	0	13	100.00
23	E2-16-9-1/ CryIA(c)	34	14	0	14	100.00
24	E2-18-1-9/ CryIA(c)	35	14	0	14	100.00

25	E2-18-2-2/ CryIA(c)	36	11	0	11	100.00
26	E2-18-7-4/ CryIA(c)	37	14	0	14	100.00
27	E2-18-8-9/ CryIA(c)	38	14	0	14	100.00
28	E1-2-4-1/ CryIA(b)	1	10	1	9	90.00
29	E2-13-7-2/ CryIA(c)	21	12	1	11	91.67
30	E2-13-2-8/ CryIA(c)	18	12	3	9	75.00
31	E2-9-3-1/ CryIA(c)	5	11	3	8	72.72
32	E2-13-3-5/ CryIA(c)	19	11	3	8	72.72
33	E2-15-4-6/ CryIA(c)	23	13	5	8	61.53
34	E2-13-4-2/ CryIA(c)	20	13	6	7	53.84
35	W 1263 (Chuẩn kháng)		14	7	7	50.00
36	E2-9-5-5/ CryIA(c)	6	12	7	5	41.67
37	E2-9-1-4/ CryIA(c)	3	12	9	3	25.00
38	E1-3-10-1/ CryIA(b)	2	15	14	1	6.67
39	IR 29 (Chuẩn nhiễm)		14	14	0	0.00

Qua thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân của các dòng biến đổi gen thế hệ T_1 và T_2 , một số kết luận có thể rút ra như sau:

- + Gen kháng sâu đục thân *cryIA(c)* hoạt động hữu hiệu ở lúa, tạo tính kháng sâu cao, trong khi giống chuẩn kháng W1263 cho phản ứng nhiễm trong thử nghiệm sinh học. Tỷ lệ số dòng biến đổi gen thế hệ T_1 kháng cấp 1 chiếm tỷ lệ đến 43,3%. Tỷ lệ số dòng biến đổi gen thế hệ T_2 cho 100% số sâu chết chiếm tỷ lệ đến 73% (27/37 dòng)
- + Số dòng biến đổi gen kháng tăng qua mỗi thế hệ và có thể sớm chọn được dòng kháng đồng hợp tử.

c) Kết luận và đề nghị về chuyển gen vào lúa

1. Quy trình sử dụng phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* và dùng súng bắn gen (Biorad) đã thử nghiệm thành công trong điều kiện tại Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long và đã được áp dụng để chuyển nạp các gen hữu dụng (kháng sâu) vào các giống lúa thuộc nhóm *indica* đang trồng phổ biến trong sản xuất (IR64, Một Bụi, KDLM105, MTL250). Với phương pháp dùng máy bắn gen, khoảng cách A với áp lực 900 hoặc 1100 psi cho hiệu quả chuyển nạp gen cao hơn ở áp lực 1350 psi. Bằng cách sử dụng phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* và hệ thống chọn lọc bằng mannose (thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hoặc chất kháng thuốc trừ cỏ), gen kháng sâu *cryIA(c)* và *cryIA(b)* đã được chuyển nạp vào các giống lúa

IR64, KDML105 và Một Bụi. Hiệu quả biến đổi gen tùy theo vector và giống lúa *indica* đã đạt trong khoảng 0,79 - 5,80%; đây là kết quả rất khả quan đối với giống lúa nhóm *indica*. Nghiên cứu này đã xác định quy trình chọn lọc bằng mannose có hiệu quả với 30 g/l + 25 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ nhất, 15g/l sucrose + 25g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ hai và 5g/l sucrose + 35g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba.

2. Các cây được chuyển nạp gen sống và phát triển trên môi trường chọn lọc có chứa mannose được kiểm định bằng phân tích Southern để khẳng định sự hiện diện của gen *cry1A(c)* hoặc *cry1A(b)*. Nghiên cứu này cũng cho thấy lợi điểm của phương pháp biến đổi gen bằng *Agrobacterium*. Gen chuyển nạp được gắn vào bộ gen cây lúa theo phương thức đơn giản ở một locus, không có sự tái sắp xếp, điều này liên quan đến tính ổn định trong sự biểu hiện của gen chuyển nạp ở các dòng biến đổi gen.
3. Các dòng biến đổi gen được thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân. Đánh giá tính kháng của các dòng lúa thử nghiệm theo thang điểm 0 - 9 dựa trên tỷ lệ số chồi chết vào 20 ngày sau khi chủng sâu ghi nhận giống chuẩn kháng W1263 có cấp 5 (nhễm nhẹ), giống chuẩn nhiễm IR29 có cấp 7 (nhễm). Trong 30 dòng biến đổi gen T₁, sự phân bố tính kháng như sau:
 - Cấp 1 (kháng): 13 dòng chiếm 43,3%
 - Cấp 3 (kháng trung bình): 10 dòng chiếm 33,3%
 - Cấp 5 (nhễm nhẹ): 3 dòng chiếm tỷ lệ 10,0%
 - Cấp 7 (nhễm): 4 dòng chiếm tỷ lệ 13,3%

Các dòng lúa biến đổi gen thế hệ T₂ được thử nghiệm với phương pháp đĩa petri. Kết quả cho thấy giống chuẩn kháng W1236 có tỷ lệ sâu chết 7/14 (50%), giống chuẩn nhiễm IR29 có 0/14 (0%). Trong 37 dòng lúa biến đổi gen, có đến 27 dòng có tỷ lệ sâu chết 100%.

4. Qua thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân của các dòng biến đổi gen thế hệ T₁, T₂ sử dụng hệ thống chọn lọc bằng manose, và thế hệ T₃, T₄ sử dụng hệ thống chọn lọc bằng kháng sinh Hyg một số kết luận có thể rút ra như sau:

Gen kháng sâu *cry1A(c)* hoạt động hữu hiệu ở lúa tạo tính kháng sâu đục thân cao, các dòng biến đổi gen kháng sâu đạt tỷ lệ cao và có tính kháng sâu đục thân hơn hẳn giống chuẩn kháng.

Số dòng biến đổi gen kháng sâu đục thân tăng qua mỗi thế hệ và có thể và tạm thời kết luận đã chọn được 1 dòng kháng sâu đồng hợp tử thế hệ T4. (C67-T4-11). Hiệu quả chuyển gen khi sử dụng hệ thống chọn lọc bằng manose dao động từ 0,79 - 5,8% và tỉ lệ là 6,6% khi sử dụng hệ thống chọn lọc bằng kháng sinh Hyg.

5. Kết quả thử nghiệm sinh học tính kháng rầy nâu của các dòng lúa biến đổi gen GNA cho biểu hiện sự kháng rầy nâu ở cấp 3 - 5, trong khi giống bố mẹ nhiễm cấp 9.
6. Kết quả phân tích 41 dòng lúa C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen *Xa21* (sống sót trên môi trường có hygromycine) bằng phương pháp PCR và thử tính kháng bệnh với khuẩn *Xanthomonas oryzae* cho thấy các dòng biến nạp không duy trì được một cách ổn định gen *Xa21*, rất có thể do kích thước của gen này quá lớn (trên 9 kb), cần tiếp tục tối ưu hoá kích thước gen và cách thức chuyển gen.
7. Đề nghị đưa phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *Agrobacterium* và sử dụng hệ thống chọn lọc mannose với quy trình xác định trong nghiên cứu này nên được ứng dụng để chuyển nạp các gen hữu dụng vào giống lúa nhóm indica.
8. Đề nghị tiếp tục chọn lọc các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đục thân các thế hệ tiếp theo với mục đích chọn được các dòng có tính ổn định di truyền.

3.6. CÁC PHƯƠNG PHÁP NHẬN BIẾT VÀ ĐÁNH GIÁ CÂY CHUYỂN GEN

3.6. Các phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen

3.6.1. Đặt vấn đề

3.6.2. Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm

3.6.2.1. Phương pháp sinh lý thử tính kháng kháng sinh

3.6.2.2. Phương pháp sinh hóa

3.6.2.3. Phương pháp sinh học phân tử

3.6.3. Thử cây chuyển gen trong nhà kính

3.6.3.1. Tạo vết cháy kháng sinh trên lá

3.6.3.2. Thử tính kháng sâu

3.6.3.3. Thử tính kháng rầy

3.6.3.4. Thử tính chịu hạn/mặn

3.6.4. Lai tạo để kiểm tra cây chuyển gen

3.6.5. Kết luận về đánh giá cây chuyển gen

3.6.1. Đặt vấn đề

Năm 1990 lần đầu tiên cây thuốc lá chuyển gen được đưa vào thử nghiệm trong sản xuất (Cohen, 2000). Tính đến năm 1996 đã có 7 loại cây trồng chuyển gen đó là: bông, cà chua, thuốc lá, ngô, khoai tây, đậu tương và cải dầu với tổng diện tích là 1,7 triệu ha (de la Cruz, Reynaldo, 1999). Tiếp theo đó, đối tượng cây chuyển gen được mở rộng sang nhiều đối tượng cây trồng khác như lúa, chuối, đu đủ, ... và diện tích trồng cây đã được chuyển nạp gen cũng không ngừng tăng lên. Đến năm 1999, diện tích cây chuyển gen đã lên tới xấp xỉ 40 triệu ha, được trồng nhiều như ở Mỹ, Canada, Úc, Argentina và Trung Quốc (de la Cruz, Reynaldo, 1999). Việc ứng dụng công nghệ sinh học nói chung và phát triển kỹ thuật chuyển gen vào cây trồng nói riêng đã đem lại nhiều cơ hội to lớn cho phép tạo ra hàng loạt cây trồng mang các gen ngoại lai qui định những tính trạng quan trọng như kháng sâu, cải tiến chất lượng sản phẩm, kháng nấm, kháng virus...

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu cây trồng chuyển gen cũng bắt đầu được tiến hành ở một số phòng thí nghiệm. Đồng thời, chúng ta cũng đang mở rộng quan hệ hợp tác với các tổ chức nghiên cứu quốc tế và các công ty nước ngoài nên không thể tránh khỏi việc du nhập của các cây và sản phẩm chuyển gen. Chính vì thế, để quản lý và sử dụng cây trồng chuyển gen một cách hiệu quả việc xác định phương pháp nhận biết cây chuyển gen là rất có ý nghĩa đối với tình hình thực tiễn hiện nay. Với mục đích lựa chọn được phương pháp nhận biết cây chuyển gen

phù hợp và hiệu quả nhất cho từng loại cây trồng chuyển gen với các đặc điểm khác nhau, chúng tôi đã tiến hành đề tài “Phương pháp nhận biết và đánh giá cây trồng chuyển gen”.

3.6.2. Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm

Trước hết phải khẳng định nguyên liệu tạo được là cây chuyển gen thực sự thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử ở mức độ phòng thí nghiệm. Xác định sự có mặt của gen trong tế bào cây chuyển gen được tiến hành bằng kỹ thuật PCR, với cặp mồi đặc hiệu của gen chuyển và DNA của dòng cây cần kiểm tra. Xác định gen chuyển được gắn vào genom cây tái sinh hay không phải thực hiện phép lai phân tử Southern mà mẫu dò là đoạn gen chuyển được đánh dấu huỳnh quang còn DNA nhân cao phân tử được tách từ mô của cây chuyển gen. Xác định gen chuyển có được phiên mã thành mRNA hay không, tức là có được bộ máy sinh tổng hợp protein chấp nhận hay không được thực hiện bằng kỹ thuật lai Northern giữa mẫu dò là đoạn DNA của gen đánh dấu huỳnh quang và ARN toàn phần của mô cây chuyển gen. Và bước cuối cùng là xác định gen chuyển có biểu hiện và tạo ra sản phẩm cuối cùng của nó là protein bằng kỹ thuật lai Western giữa protein của cây chuyển gen và kháng thể đặc hiệu với protein đó được tinh sạch từ nguồn khác. Mặt khác hoạt tính gen chuyển còn được thử bằng các phép thử chỉ thị như thử tính kháng kháng sinh, thử tính diệt sâu, nhưng ở qui mô phòng thí nghiệm và qui mô nhà lưới.

Điểm tiếp theo là phải xác định phương thức và đặc điểm di truyền của gen chuyển và tính trạng được gen chuyển mã hoá đồng thời kiểm tra mức độ đồng hợp tử của thế hệ con cái chúng bằng cách lai chéo hay tự phối và phép thử tính kháng kháng sinh.

- Tiến hành sàng lọc cây chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh chọn lọc.
- Sàng lọc cây chuyển gen bằng phản ứng PCR gen chuyển.
- Lai Southern giữa mẫu DNA dò với DNA genom cây chuyển gen xác định số lượng bản gen chuyển trong genom cây nhận.
- Lai Northern giữa mẫu dò với RNA cây chuyển gen.
- Lai Western giữa protein cây chuyển gen với kháng thể đặc hiệu.
- Trồng cây thu hạt đối với cây nhân giống bằng hạt, thử kháng sinh để đánh giá mức độ đồng hợp tử của gen chuyển.

3.6.2.1. Phương pháp sinh lý thử tính kháng kháng sinh

a) Hạt nảy mầm trên KS

Vật liệu: Các giống bông VN-36, LRA5166, TM1, SB1 và các giống bông mang gen kháng sâu CS92, CS95, CS96, VN01-6, VN16, CRI29 do Viện Nghiên cứu cây bông và cây có sợi Nha Hố, Ninh Thuận cung cấp.

Phương pháp: Hạt bông được bóc vỏ và đặt trên môi trường MS (Vitamin B5, pH 5,8) có bổ sung Km ở các nồng độ khác nhau 0; 100 mg/l; 200mg/l; 400mg/l; 600mg/l; 800mg/l và 1000mg/l.

Kết quả: Nhìn vào kết quả chúng tôi nhận ở nồng độ 100mg/l Km thì tất cả các cây đối chứng hạt nảy mầm có lá mầm chuyển sang màu vàng, cây không có rễ. Trong khi đó với các cây bông đã chuyển gen kháng sâu thì hạt vẫn nảy mầm bình thường có lá mầm màu xanh, cây có rễ. Ngưỡng nồng độ nồng độ Km cao nhất cây bông có khả năng chống chịu được để sống sót và sinh trưởng bình thường là 500mg/l nồng độ thích hợp để sàng lọc các dòng cây bông chuyển gen sau khi tiêm bông và thu hoạch quả.

Bảng 48. So sánh khả năng nảy mầm giữa 2 giống bông kháng sâu và đối chứng trên môi trường MS có bổ sung Km

Giống	Nồng độ Kanamycine (mg/l)						
	0	100	200	400	600	800	1000
CS96	+++	+++	+++	+++	++	++	+
VN36P	+++	++	++	++	+	+	-

+++ : Hạt nảy mầm tốt với tỷ lệ > 80%, lá xanh và có rễ; ++ : hạt nảy mầm với tỷ lệ từ 60-80%, lá vàng và không có rễ; + : hạt nảy mầm với tỷ lệ < 50%, lá vàng và không có rễ; - : hạt không nảy mầm



Hình 88. Cây bông chuyển gen và cây bông đối chứng nảy mầm trên môi trường chọn lọc

b) Cấy mô trên môi trường chứa KS

- *Phương pháp*: Các lá bánh tẻ của cây bông nuôi cấy invitro được cắt thành những mảnh nhỏ với kích thước 5x5mm và đặt chúng lên môi trường MS có bổ sung Km với các nồng độ khác nhau (0, 100, 200, 300mg/l) và đánh giá tỉ lệ sống của các mảnh lá cây sau 5 tuần.

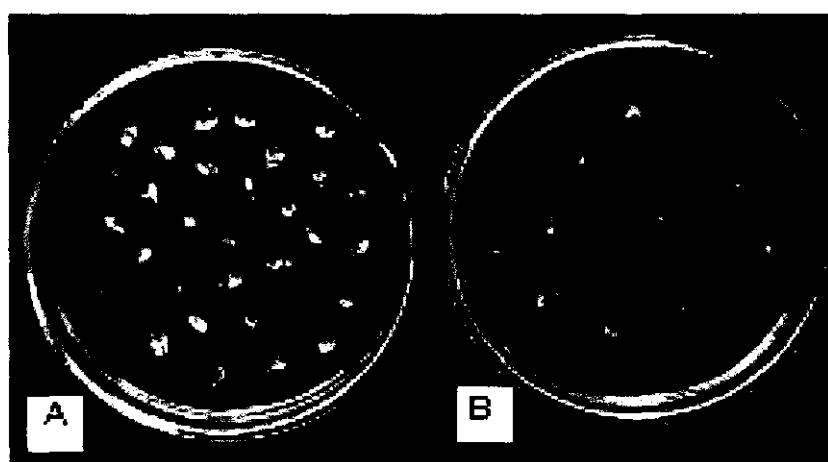
- Kết quả

Thử tính kháng kháng sinh từ mảnh lá *invitro* của các giống bông chuyển gen kháng sâu CS95, 96 và giống đối chứng LRA5166, VN36-P: giống đối chứng không kháng sâu; CS95, CS96: giống bông kháng sâu.

Sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung Km ở các nồng độ khác nhau, các mảnh lá bông của cây đối chứng chuyển sang màu vàng và màu nâu, tỷ lệ các mảnh lá màu xanh là rất thấp và thấp nhất ở giống LRA là 0% ngay ở nồng độ 100mg/l. Đối với các giống bông chuyển gen kháng sâu như CS 95; 96 có tỷ lệ mảnh lá màu xanh cao hơn và đạt cao nhất là 44,8%.

Bảng 49. Tỉ lệ sống sót ở các mảnh lá của các giống bông trên môi trường MS có bổ sung Km

Giống	VN 36-P			LRA5166		CS95		CS96		
Nồng độ Km(mg/l)	0	100	300	100	200	200	300	0	100	300
Số mảnh lá sống sót/tổng số (%)	72,7	7,4	3,6	0	0	23	44,8	93,8	41,7	44



Hình 89. Mảnh lá của cây bông chuyển gen (A) và cây bông đối chứng (B) trên môi trường chọn lọc

3.6.2.2. Phương pháp sinh hóa

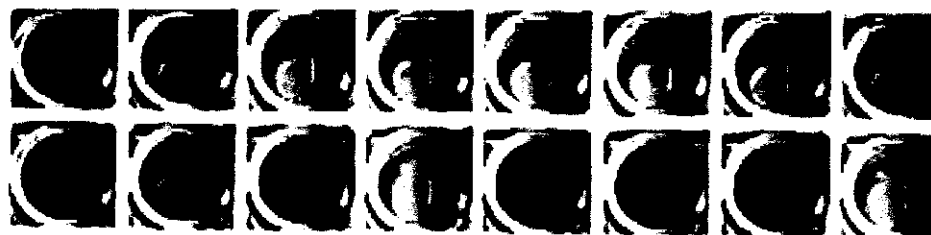
a) Phân tích sự biểu hiện của gen *nptII* ở các dòng bông chuyển gen bằng phương pháp Elisa

Vật liệu: Trong thí nghiệm này chúng tôi chọn các dòng bông chuyển gen

kháng sâu CRI29, CS95, các dòng bông lai giữa các dòng kháng sâu và các dòng không chuyển gen VN-15, VN-16 (F1), và VN-15, VN-16 (F2), và các dòng bông không chuyển gen đối chứng SB1. Các dòng bông này do Viện NCCB & CCS cấp

Phương pháp: Thu 100mg mẫu lá bông trồng ngoài trại thực nghiệm vào các ống eppendofit 2ml, giữ ở -80°C cho tới khi sử dụng. Tiến hành nghiền nhanh lá trong nitơ lỏng, sau đó bổ sung 0,5ml đệm chiết (1,3g Na_2SO_3 ; 20g PVP; 0,2g Sodium azide; 2g albumin; 20g Tween-20 tan trong 1L PBST 1X), pH7,4. Vortex 30-60 giây. Ly tâm tốc độ 10.000 v/p, trong 5 phút. Hút 100 μl dịch chiết cho vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng. ủ mẫu khoảng 2 giờ ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C . Sau khi ủ rửa đĩa nhiều lần (4 - 6 lần) bằng PBST 1X. Làm khô đĩa bằng cách úp lên giấy thấm vô trùng. Tiếp theo bổ sung enzym hiện màu (Chỉ chuẩn bị trước khi sử dụng 10 phút) 100 μl /giếng, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa đĩa nhiều lần và làm khô đĩa như trên. Bổ sung cơ chất hiện màu TMB và ủ khoảng 15 phút. Dùng phản ứng bằng axit H_2SO_4 3M. Cơ chất chuyển từ màu xanh sang màu vàng. Có thể quan sát sự sai khác bằng mắt thường hoặc đọc trên máy đo quang phổ.

Kết quả cho thấy các dòng bông lai giữa dòng chuyển gen kháng sâu và dòng không chuyển gen (thế hệ F_1 , F_2) vẫn cho kết quả Elisa dương tính. Kết quả này cũng rất phù hợp với kết quả đánh giá tính kháng sâu và phân tích phân tử các dòng này (Tài liệu chưa công bố).



Hình 90. Phân tích ELISA các dòng bông chuyển gen

Hàng trên: A1: protein nptII 3ng/ml, A2: 0,75ng/ml, A3,A4: blank, A5: Vn-36P, A6: LRA, A7: VN-15, A8: VN-15 (pha loãng 2 lần)

Hàng dưới: B1: C118a, B2: VN-16, B3: VN-016, B4: CS95, B5: SB1, B6: VN-015, B7: CRI29, B8 CRI29 (pha loãng 2 lần). Các giống CS95, CRI29(Fo), VN-15, VN-16 (F1), và VN-015, VN-016 (F2) cho kết quả dương tính

b) Xác định gen *gus* bằng phương pháp thử với cơ chất sinh màu

β -Gluconidase (*gus*) dễ bị thủy phân trong dung dịch X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Gluconidase) không màu sẽ tạo ra màu xanh đặc trưng. Rễ cây lúa chuyển gen kháng sâu được cắt nhỏ thành từng đoạn và ngâm vào dung dịch X-gluc trong 24h ở nhiệt độ 37°C để quan sát sự thay đổi màu sắc của rễ.

Kết quả: Các đoạn cắt của các bộ phận sinh dưỡng của cây lúa sau khi ngâm trong dung dịch X-gluc sau 24h cũng thể hiện khác nhau: Mô của các đoạn cắt ở

cây chuyển gen đều chuyển sang màu xanh, còn mô của các đoạn cắt ở cây không chuyển nạp thì không có màu xanh (Hình 91).



Hình 91. Sự thể hiện của gen *gus* của rễ cây lúa chuyển nạp gen kháng sâu trong dung dịch X-gluc

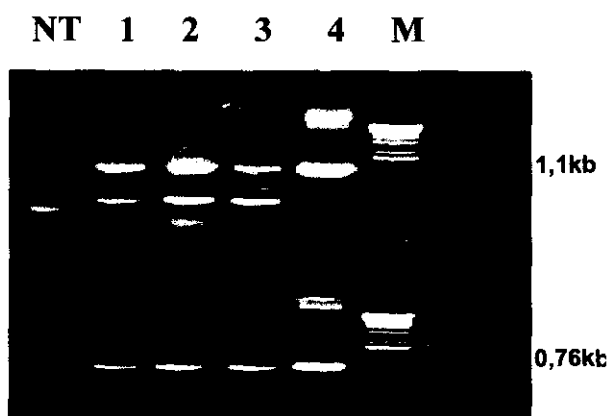
3.6.2.3. Phương pháp sinh học phân tử

a) PCR

Phương pháp: 10ng AND mẫu, 5ng cho một primer, 0,16mM dNTPs, 1 đơn vị PCR Buffer (10mM Tris, pH=8.4, 50mM KCl và 15mM MgCl₂), 1 đơn vị Taq polymerase. Chương trình PCR được thiết kế với bước 1 ở 94°C trong 5 phút (35 vòng); bước 2: 94°C 30 giây; bước 3: 55°C 30 giây ; bước 4: 72°C trong 1 phút.

Kết quả

Kết quả AND của cây chuyển gen và cây đối chứng sau khi được nhân lên qua phản ứng PCR cho thấy có sự có mặt của các gen chuyển (*gus*, *hpt*) trong cây lúa chuyển gen kháng sâu so với đối chứng là không có (Hình 92).



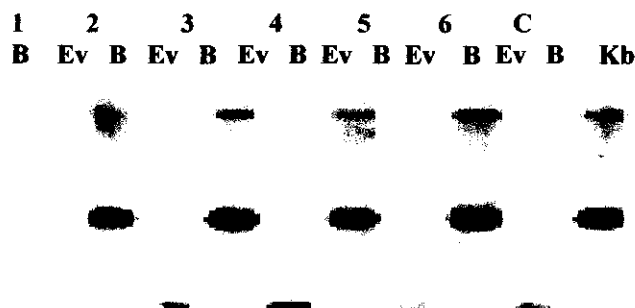
Hình 92. Sự thể hiện của gen *gus* (1,1kb) và gen *hph* (0,76kb) ở cây đã chuyển gen (1-4) so với đối chứng (NT) và so với vạch chuẩn (M)

b) Phép lai Southern (Southern blotting)

Phương pháp: DNA tổng số được chiết xuất từ lá non của cây lúa chuyển nạp gen (T₀, T₁) và của cây chưa chuyển nạp gen theo (Dellaporta và CS, 1983). Hai

enzyme giới hạn là *EcoRV* và *BamHI* đã được sử dụng để cắt DNA của cây chuyển gene. Sau khi điện di trên gel agarose 0,8%, DNA được chuyển lên màng Hybond-N⁺ (Amersham) và được lai với mẫu dò (đoạn DNA 660 bp có chứa phân tử phóng xạ [³²P] dCTP).

Kết quả: DNA của cây chuyển gen và cây đối chứng sau khi được xử lý với enzyme giới hạn *EcoRI* và *BamHI* (Sở dĩ chúng tôi chọn các enzyme này vì chúng không có các điểm cắt trong trình tự của gen ngoại lai *cryIA(c)* được lai với mẫu dò có đánh dấu bằng đồng vị [³²P] (Hình 93).

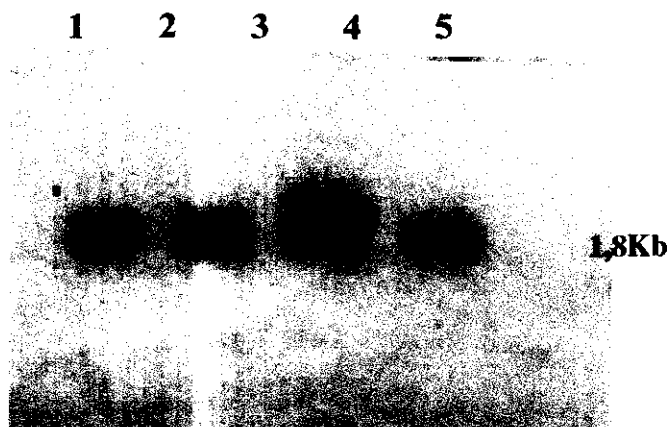


Hình 93. Kết quả lai ADN (Southern blotting)
1-6: cây chuyển nạp gen . B: BamHI; Ev: EcoRV; C : Đối chứng

Kết quả hiện phim của lai DNA Hình 93 cho thấy: ở tất cả các cây chuyển gen đều thể hiện sự có mặt của gen ngoại lai thông qua sự thể hiện vị trí vạch tương ứng với của *BamHI* (tương ứng 1,8kb) và của *EcoRV* (9,4kb), trong khi đó ở băng đối chứng hoàn toàn không có các vạch đặc trưng này.

c) Phép lai Northern (Northern blotting)

Khả năng hoạt động của gen trong tế bào cây chủ được đánh giá thông qua ARN tổng số theo quy trình của Sambrook và CS (1989).



Hình 94. Kết quả lai ARN (Northern blotting)

1-4 : Cây chuyển nạp gen ; 5: Đối chứng (cây chưa chuyển nạp)

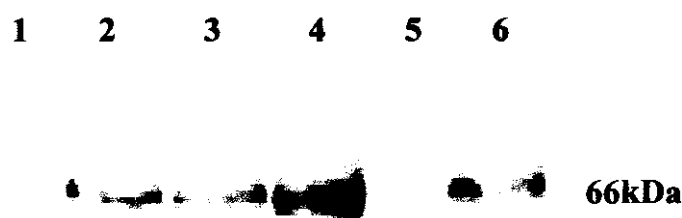
Kết quả: Sản phẩm phiên mã trong qua trình biểu hiện gen *cryIA(c)* ở trong cây chuyển nạp gen là mARN được đánh giá qua kết quả phân tích mRNA (Northern Blott) (Hình 94) cho thấy: Sản phẩm phiên mã của 4 cây chuyển nạp gen đều thể hiện ở mức cao tương ứng với kích thước phân tử là 1,8kb, còn ở cây đối chứng thì không thấy có sự biểu hiện nào.

d) Phép lai Western (Western blotting)

Protein tổng số được chiết xuất từ mô lá của cây chuyển nạp gen và cây chưa chuyển nạp gen được dùng để đánh giá sản phẩm protein của cây chuyển nạp gen. Protein sau khi điện di trên gel SDS - acrylamide được chuyển lên màng nitrocellulose. Sau đó màng này được cố định bởi sữa TBST 24 giờ rồi lai với mẫu dò (kháng thể thử 1 ngày).

Trong tất cả các phép thử trên, DNA, ARN và protein của cây lúa chưa chuyển nạp được sử dụng như mẫu đối chứng.

Lai Western qua kết quả phép lai này, chúng tôi cũng nhận thấy sự khác biệt giữa cây chuyển nạp gen (từ 2 - 6) và cây không được chuyển nạp (cây 1) các cây được chuyển nạp với *cryIA(c)* đều có biểu hiện của vạch đặc trưng tại vị trí 66kDa, trong khi cây đối chứng không hề có vạch này.



Hình 95. Kết quả phản ứng Western blot

3.6.3. Thử nghiệm cây chuyển gen trong nhà kính

3.6.3.1. Tạo vết cháy kháng sinh trên lá

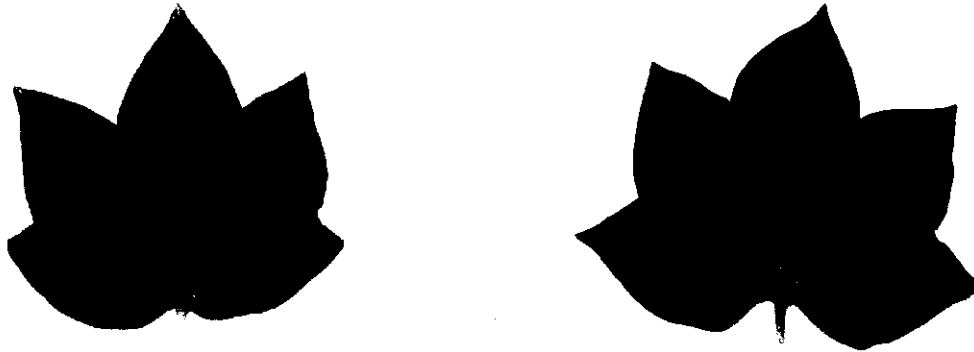
a) Vật liệu

Các giống bông VN-36, LRA5166, TM1, SB1 và các giống bông mang gen kháng sâu CS92, CS95, CS96, VN01-6, VN16, CRI29 do Viện Nghiên cứu cây bông và cây có sợi Nha Hố, Ninh Thuận cung cấp.

b) Phương pháp

- Thử tính kháng Km trực tiếp lên lá non cây bông trồng ngoài nhà lưới.

Km được pha với các nồng độ khác nhau 0,25g/l ; 0,5g/l; 1g/l và 1,5g/l trong nước có Tween nồng độ 5%. Sau đó lấy 15 μ l ở mỗi nồng độ trên nhỏ trực tiếp lên trên lá bông non và đánh giá sự ngả màu vàng tại chỗ sau 7-10 ngày.



Hình 96. Thử tính kháng Km của 2 giống bông kháng sâu (phải) và giống bông đối chứng không kháng sâu. Nồng độ Km lần lượt từ trái sang là 0; 0,25 ; 0,5; 1; 1,5g/L

3.6.3.2. Thử tính kháng sâu

a) Vật liệu

Các cây lúa đời T_0 và T_1 của giống lúa IR64 (một giống lúa thuộc loài phụ *S. indica*, được lai tạo và chọn lọc tại Viện Nghiên Cứu Lúa Quốc Tế-IRRI) đã được chuyển gen kháng sâu đục thân lúa màu vàng *cryIA(c)* thông qua vector chuyển gen đã biết gồm gen chuyển *cryIA(c)*, gene chỉ thị (*gus*) và gene chọn lọc kháng hygromycin (*hph*).

b) Phương pháp

Tính độc của cây lúa đã được chuyển gen kháng sâu đục thân lúa màu vàng được tiến hành bằng hai cách:

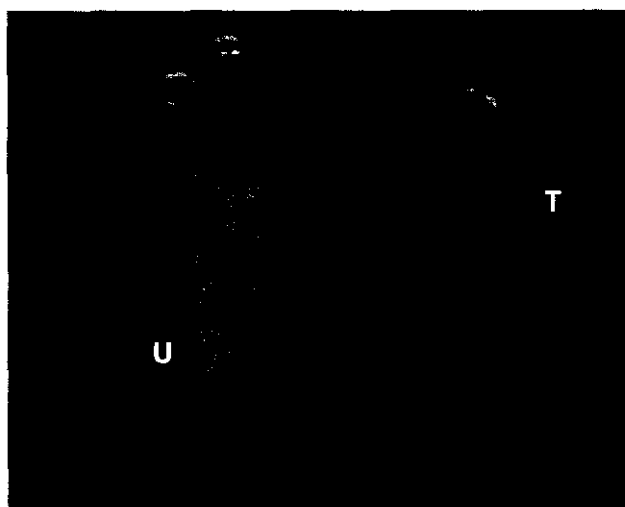
Cách 1: Thân, lá của cây lúa chuyển gen kháng sâu (T_0 , T_1) và thân lá của cây đối chứng được cắt thành từng mảnh dài 5cm rồi đặt mỗi loại trong 10 đĩa petri có lót sẵn giấy thấm ẩm. Mỗi đĩa để 10 con sâu non của sâu đục thân lúa màu vàng, sau đó ủ ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 70%. Tỷ lệ sâu non giảm trọng lượng và chết trong từng đĩa đã được quan sát và ghi lại sau 5 ngày, mỗi đĩa được coi như một lần lặp lại.

Cách 2: Cho sâu non ăn trực tiếp protein được tạo ra ở trong cây lúa chuyển nạp gen kháng sâu. Thân lá lúa được nghiền trong nitơ lỏng, protein tổng số được chiết xuất từ mô của cây lúa được bổ sung thêm vào thành phần ăn của sâu non (khoảng 2,5ng dịch chiết protein trong 250 μ l của khẩu phần ăn). Sau khi làm đặc môi trường

có chứa khẩu phần ăn bằng agar, đặt 5 con sâu non vào mỗi đĩa với 10 lần nhắc lại. Tỷ lệ chết của sâu non và sự giảm trọng lượng được đánh giá sau 5 ngày.

c) Kết quả

Sâu non của sâu đục thân hai chấm bắt đầu chết sau hai ngày ăn thân của cây chuyển nạp gen *cryIA(c)*, còn sâu non ăn thân của cây không chuyển nạp thì vẫn sống và phát triển bình thường. Tỷ lệ sâu non bị chết là 73%. Khi ăn trực tiếp mô lá của cây đã chuyển gen thì sâu non chết hoặc thể hiện màu nâu điển hình trước khi chết (Hình 97, Bảng 507, 51).



Hình 97. Kết quả phép thử sinh học đối với cây chuyển gen *cryIAc*. T: Sâu non ăn lá cây chuyển nạp gen; U: Sâu ăn lá cây chưa chuyển nạp gen

Bảng 50. Kết quả thử độc tính của *cryIA(c)* ở mô lúa chuyển gen trên ấu trùng sâu đục thân

Vật liệu	(%) sâu non bị chết	Tỷ lệ cây bị hại (%)
Cây chưa chuyển gen (Đ/C)	0	100
Cây chuyển gen <i>CryIA(c)</i>	73.5	71.3

Bảng 51. Độc tính của protein từ cây lúa chuyển gen *cryIA(c)* (0.2g thân lá) đối với ấu trùng của sâu đục thân lúa hai chấm

Các cây chuyển gen	Hàm lượng độc /dịch chiết protein tổng số	Tỷ lệ chết của sâu non(%)	Tỷ lệ giảm trọng lượng cơ thể (%)
1	0.012	74.5	76.0
2	0.015	82.2	79.2
3	0.018	86.5	79.6
4	0.011	72.2	73.2
5	0.013	81.5	78.0
6	0.020	91.4	82.6
ĐC cây chưa chuyển gen)	0	6.10	0.0

Phép thử độc tính của cây với dịch chiết protein từ mô lá cây chuyển gen được

thêm vào khẩu phần ăn của sâu cho thấy: Tỷ lệ sâu non bị chết dao động từ 72,2 đến 91,4%. Tỷ lệ giảm trọng lượng cơ thể từ 73,2 đến 82,6 % và sâu non không thể kết nhộng.

3.6.3.3. Thử tính chịu hạn/mặn

a) Đặt vấn đề

Hạn là một trong số các nhân tố chính gây ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng phát triển và làm giảm năng suất của cây trồng, đặc biệt là cây lúa (Yancey và CS, 1982). Trong 130 triệu hecta đất trồng lúa trên thế giới thì có tới 26 triệu hecta đất bị hạn nặng, gây ảnh hưởng đến năng suất (Boyer và CS, 1982; Ray Wu và CS, 2003). Mặc dù trong hai thập kỷ qua đã có những thành công trong chọn giống truyền thống, tạo ra những giống lúa có khả năng chịu hạn, song những thành công này chưa hạn chế được nhiều thiệt hại do hạn gây ra. Mặt khác, việc sử dụng các phương pháp chọn giống truyền thống phải mất rất nhiều thời gian. Gần đây, với sự phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học hiện đại, các nhà khoa học đã sử dụng các kỹ thuật di truyền để phân tích, nghiên cứu tạo cây lúa có khả năng chống chịu tốt với điều kiện bất lợi (LeRuduleer và CS, 1984; Lê Trần Bình và CS, 1997). Sự kết hợp các kỹ thuật di truyền hiện đại có thể tạo ra cây chuyển gen chịu hạn nhanh hơn và hiệu quả hơn so với các phương pháp chọn giống truyền thống, đặc biệt đối với cây lúa. Hiện nay, cơ chế chịu hạn ở cây lúa và ở một số sinh vật đã được làm sáng tỏ là do khả năng tích lũy cao một số chất thẩm thấu bảo vệ tế bào (*osmoprotectants*) có trong nội bào do một số gen chức năng điều khiển như: betaine, proline, ectoine, polyols, và trehalose. Các chất này làm tăng áp suất thẩm thấu tế bào, góp phần bảo vệ màng tế bào khỏi tổn thương khi bị hạn. Nhiều nghiên cứu đã phân lập được một số gen điều khiển tính chịu hạn từ vi khuẩn, nấm men và một số sinh vật khác để chuyển vào cây lúa tạo ra cây lúa chuyển gen có tính chịu hạn cao.

Một trong các dự án nghiên cứu tạo cây chuyển gen chịu hạn là dự án INCO (Chương trình hợp tác với các nước đang phát triển). Trong khuôn khổ hoạt động của dự án này, các nhà khoa học đã phân lập được gen *tps1* (*yeast trehalose-6-P synthase*) điều khiển quá trình sinh tổng hợp trehalose (Romero và CS, 1997), gen *oat* (*ornithine- δ -aminotransferase*) điều khiển quá trình vận chuyển ornithine (Roossens và CS, 1998) phân lập từ thực vật, và gen *hal* phân lập từ nấm men, tuy chưa rõ cơ chế nhưng có khả năng chịu muối ở cà chua, dưa hấu và lúa mạch (INCO annual report 1998 - 2000) và chuyển vào giống lúa Zhongzua (lúa *Japonica*) để nghiên cứu sự liên quan đến tính chịu hạn. Hạt của các dòng lúa chuyển các gen này được phân tích bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR

(Polymerase Chain Reaction), Southern ở các thế hệ T_0 , T_1 , T_2 đã khẳng định sự có mặt các gen chuyển. Tuy nhiên, các cây chuyển gen cần phải được đánh giá để kiểm tra sự biểu hiện ở các gen này có thực sự làm tăng khả năng chịu hạn cho cây hay không và trong số các gen được chuyển gen nào có ý nghĩa nhất.

Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá các dòng lúa Zhongzua chuyển gen chịu hạn TPS, OAT, HAL ở giai đoạn lúa đẻ nhánh bằng phương pháp gây hạn nhân tạo thông qua một số chỉ tiêu sinh khối như trọng lượng tươi, khô của rễ, thân và đặc biệt là chỉ số chịu hạn để khẳng định các cây lúa chuyển gen này thực tế có được làm tăng khả năng chịu hạn hay không, các cây chuyển gen này có xuất hiện đặc tính gì khác lạ hay không thông qua phân tích biểu hiện kiểu hình của lá, thân và rễ liên quan tới phản ứng của cây lúa trong điều kiện gây hạn nhân tạo trong nhà lưới.

b) Vật liệu và phương pháp

Vật liệu: Hạt của các dòng lúa Zhongzua chuyển gen *tps*, *oat*, *hal* bao gồm: Hai dòng lúa chuyển gen *tps* điều khiển sinh tổng hợp trehalose (3TPS 32.5, 4TPS 5.1); một dòng lúa chuyển gen *hal* (Hình 19.1) chưa rõ cơ chế nhưng có khả năng chịu muối ở cà chua, dưa hấu, lúa mạch; hai dòng lúa chuyển gen *oat* (4 *oat* 10.1, 4 *oat* 12.1) điều khiển quá trình vận chuyển orthinine đã kiểm tra sự có mặt của các gen chuyển bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, lai southern ở thế hệ T_2 , và đối chứng là giống lúa Zhongzua 321 không chuyển gen do dự án INCO, Brussel, Bỉ cung cấp.

*** Phương pháp**

i) Đánh giá khả năng chịu hạn

Phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn của lúa ở giai đoạn lúa đẻ nhánh và xác định chỉ số chịu hạn tương đối được thực hiện dựa theo Đinh Thị Phòng và CS (2001) có cải tiến.

Hạt lúa T_2 của các dòng chuyển gen được ngâm, ủ cho nảy mầm ở nhiệt độ 30°C. Các mầm cây 10 ngày tuổi được cấy vào các chậu đất kích thước 10cm x 20cm với mật độ 10 mầm cây/1 chậu (khối lượng đất là 1,2 kg/1 chậu, chất lượng đất ở các chậu đồng đều). Sau 20 ngày cho cây lúa phát triển bình thường, các chậu cây được rút nước để hạn, khi trong công thức thí nghiệm xuất hiện 1/2 số cây héo thì bắt đầu tưới phục hồi. Lượng nước cung cấp chỉ đủ cho cây phục hồi khoảng 6 giờ/ngày. Chu kỳ tưới bổ sung được thực hiện lặp lại 30 lần. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện nhà lưới có mái che, trong cùng một chế độ chăm sóc.

Kết thúc chu kỳ tưới phục hồi lần cuối cùng, các cây lúa được thu và đánh giá các chỉ tiêu về chiều dài rễ, thân; trọng lượng tươi của rễ, thân; trọng lượng khô của rễ, thân.

Chỉ số chịu hạn tương đối (S) của các dòng được tính theo công thức: $S = 1/2 \sin \alpha (RL \times TL + TL \times FWr + FWr \times FWt + FWt \times DWr + DWr \times DWt + DWt \times RL)$.

RL: Chiều dài rễ

TL: Chiều dài thân

FWr: Trọng lượng tươi của rễ

FWt: Trọng lượng tươi của thân

DWr: Trọng lượng khô của rễ

DWt: Trọng lượng khô của thân

α : Góc tạo bởi 2 trục mang trị số gần nhau và tính bằng $360/x$

x: số chỉ tiêu theo dõi

ii) Đánh giá khả năng chịu muối

Hạt lúa được cho nảy mầm trên môi trường MS + Hygromycine 50mg/l. Sau đó cây lúa thí nghiệm được dán nhãn trồng trong các xô đất kích thước 30 x 40cm chứa 3kg đất/1 xô. Các lô xử lý nhiễm mặn được bổ sung 1,8 liter muối NaCl ở các nồng độ 100mM, 150mM, 200mM. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại trong hai điều kiện đất được xử lý nhiễm mặn và đất không nhiễm mặn.

Các lô thí nghiệm xử lý nhiễm mặn và lô đối chứng được tiến hành đồng thời trong điều kiện nhà lưới có mái che, chế độ chiếu sáng, độ ẩm, nhiệt độ và các điều kiện môi trường khác là đồng nhất.

Cây lúa 20 ngày tuổi được dán nhãn, trồng riêng rẽ và ngẫu nhiên, 5 cây/ 1 xô. Chế độ chăm sóc, bón phân và tưới hàng ngày như nhau, duy trì mức nước trong xô ngập đất 1 cm. Đất trồng được xới nhẹ cẩn thận hàng tuần tạo sự đồng đều.

Cây lúa được trồng cho tới khi thu hoạch. Các số liệu được thu thập và đánh giá theo các chỉ tiêu: Thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh/ bông, trọng lượng hạt/ cây, tích lũy chất khô của tất cả các cây trồng trong đất thường và đất nhiễm mặn.

c) Kết quả và thảo luận

i) Đánh giá tính chịu hạn

Hình thái các dòng lúa trong thí nghiệm quan sát được là sau khi xử lý hạn,

lá của cây không chuyển gen bị héo co hình chữ V. Khi kéo dài chu kỳ hạn, một số lá này bị héo vàng, không thể hồi xanh trở lại và cây bị chết, trong khi đó ở cây chuyển gen, một số lá chỉ bị héo co hình chữ V và sau khi được tưới nước, những lá này nhanh chóng hồi phục trở lại (Hình 98). Ngoài ra, giữa các dòng cây chuyển gen và dòng cây không chuyển gen không thấy sự khác biệt đặc biệt nào. Theo kết quả nghiên cứu chuyển gen chịu hạn *tps* vào giống lúa *Japonica basmati* thành công của Ray Wu và CS (2002), các tác giả khẳng định: cây lúa chuyển gen có khả năng hồi phục trở lại là do hàm lượng các chất thẩm thấu trong cây cao, giúp duy trì cấu trúc và chức năng tế bào trong điều kiện khô hạn. Lượng đường trong cây được tổng hợp, giúp tế bào hồi phục lại chức năng và năng suất khi điều kiện hạn đi qua (Ray Wu và CS, 2002).



Hình 98. Các dòng lúa Zhongzua phục hồi sau 30 ngày xử lý hạn

1. 3TPS 32.5; 2. 4OAT 10.1; 3. Zhongzua 321

Số liệu thu được sau 30 chu kỳ xử lý hạn được trình bày ở Bảng 52.

Bảng 52. Một số chỉ tiêu theo dõi của các dòng lúa chuyển gen khi bị xử lý hạn 30 ngày

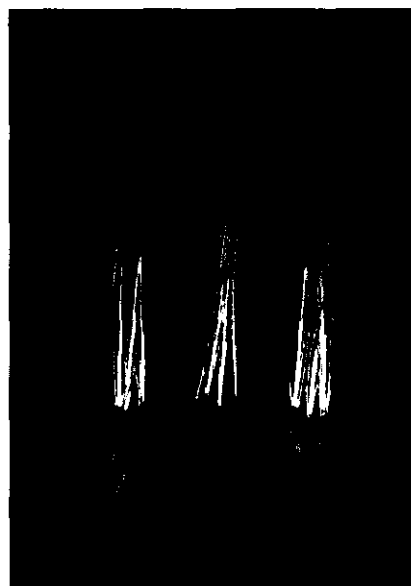
Tên dòng	TS* nhánh	RL (cm)	% so đc (%)	TL (cm)	% so đc (%)	FWr (g)	FWt (g)	DWr (g)	% so đc (%)	DWt (g)	% so đc (%)
3TPS 32.5	1.3	15.9	134.7	53.5	129.2	1.06	2.54	0.25	178.6	0.62	187.9
4OAT 10.1	1.3	16.0	135.6	52.9	127.8	1.12	2.70	0.26	185.7	0.68	206.1
3H 19.1	0.1	15.2	128.8	49	118.4	0.65	1.66	0.18	128.6	0.44	133.3
4OAT 12.1	0.4	14.5	122.9	47.8	115.5	0.63	1.73	0.15	107.1	0.42	127.3
4TPS 5.1	0.2	15.2	128.8	42.3	102.2	0.68	1.61	0.18	128.6	0.40	121.2
Zhongzua 321 (đ/c)	0.1	11.8	100.0	41.4	100.0	0.43	1.20	0.14	100.0	0.33	100.0

*Ghi chú: TS: Tổng số; RL: Chiều dài rễ; đ/c: Đối chứng; TL: Chiều dài thân; FWr, FWt: Trọng lượng tươi rễ, thân; DWr, DWt: Trọng lượng khô rễ, thân.

Kết quả thí nghiệm (Bảng 52) cho thấy các dòng 4OAT 10.1; 3TPS 32.5; 4OAT 12.1; 4TPS 5.1 trong khi xử lý hạn vẫn đẻ nhánh, số nhánh dao động 0,2-1,3

nhánh/10 cây trong khi các cây không chuyển gen Zhongzua 321 (đối chứng) không đẻ nhánh. Điều này chứng minh rằng trong điều kiện hạn, các dòng cây được chuyển gen chịu hạn có khả năng phát triển tốt hơn so với cây không chuyển gen.

Nhiều phản ứng khác nhau xảy ra ở cây lúa có khả năng chịu hạn để thích ứng khi xử lý hạn như là sự phát triển của bộ rễ. Bộ rễ phát triển về độ dài để ăn sâu, hoặc gia tăng về số lượng để tăng khả năng hút nước. Quan sát hình thái bộ rễ của cây lúa chuyển gen và không chuyển gen cho thấy, bộ rễ của cây chuyển gen có hai xu hướng phát triển tăng độ dài và tăng số lượng, rất khác biệt so với cây không chuyển gen (Hình 99).



Hình 99. Bộ rễ và thân các dòng lúa Zhongzua sau xử lý hạn

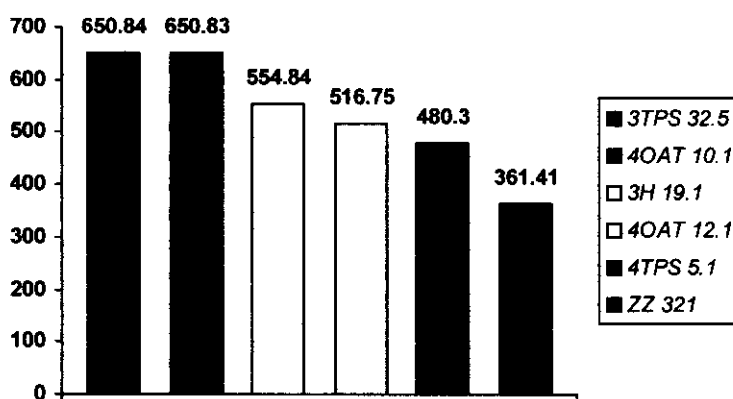
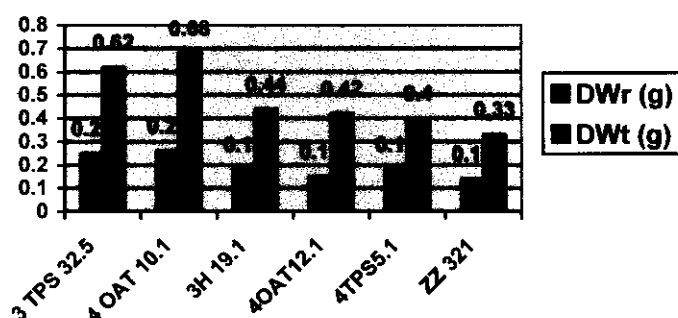
1. 3TPS 32.5; 2. Zhongzua 321; 3. 4OAT 10.1

So sánh hình thái rễ, thân (Hình 97) và chiều dài, trọng lượng khô của rễ, thân (Bảng 52) cho thấy không chỉ có sự khác biệt về khả năng phát triển của các dòng chuyển gen so với dòng không chuyển gen mà còn ở mức độ tăng (%) của chiều dài và trọng lượng tươi, khô của rễ và thân. Các dòng cây chuyển gen đều có chiều dài rễ và thân tăng hơn so với cây không chuyển gen. Trong đó, dòng 4OAT 10.1 có chiều dài rễ cao nhất đạt 16,0cm, tăng 35,6% so với dòng đối chứng (cây không chuyển gen). Dòng 3TPS 32.5 có chiều dài thân cao nhất, đạt 53,5cm, tăng 29.2% so với dòng đối chứng. Các kết quả cho thấy các dòng cây chuyển gen trong điều kiện hạn đã thể hiện khả năng phát triển tốt hơn so với cây không chuyển gen, do tăng sự tích lũy hàm lượng các chất thẩm thấu, làm tăng khả năng chịu hạn cho cây, đặc biệt, dòng 3TPS 32.5 và 4OAT 10.1 có chiều dài rễ và thân tăng cao nhất.

Trọng lượng tươi và khô của rễ và thân của các dòng nghiên cứu cũng được

xác định nhằm đánh giá sự biểu hiện của cây lúa chịu hạn. Kết quả ở Bảng 46 cho thấy: tất cả các dòng cây chuyển gen đều có trọng lượng tươi, khô của rễ và thân cao hơn so với cây đối chứng không chuyển gen, trong đó, dòng 4OAT có trọng lượng tươi, khô trung bình của rễ và thân cao nhất. Trọng lượng khô của rễ đạt 0,26g tăng 85,7%, trọng lượng khô của thân đạt 0,68g tăng 106,1% so với cây đối chứng. Đặc biệt hai dòng 4OAT 10.1 và 3TPS 32.5 có trọng lượng khô của rễ và thân tăng cao nhất. Mức độ biến động chiều dài rễ và thân của các dòng cây thử nghiệm được thể hiện ở Hình 100.

Hình 100. Biến động trọng lượng khô của rễ thân của các dòng



Hình 101. Chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng

Các kết quả phân tích trọng lượng tươi, khô nêu trên cho thấy trong điều kiện hạn, các cây chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn do duy trì hoạt động tích lũy hàm lượng các chất cao hơn cây không chuyển gen, do đó mà hàm lượng chất khô cũng cao hơn.

Chỉ số chịu hạn tương đối S và tỷ lệ khác biệt giữa các dòng chuyển gen so với dòng không chuyển gen được trình bày ở Bảng 53.

Kết quả (Bảng 53) cho thấy dòng 3TPS 32.5 và dòng 4OAT 10.1 có chỉ số chịu

hạn cao nhất đồng thời là hai dòng có khả năng chịu hạn tốt nhất. Mức độ chịu hạn của các dòng còn được thể hiện ở Hình 100.

Bảng 53. Chỉ số chịu hạn tương đối của một số dòng lúa chuyển gen

TT	Tên dòng	S	% so với đối chứng
1	3TPS 32.5	650.84	180.08
2	4OAT 10.1	650.83	180.08
3	3H 19.1	554.84	153.52
4	4OAT 12.1	516.75	142.98
5	4TPS 5.1	480.30	132.90
6	zz 321	361.41	100.00

Mức độ chịu hạn thể hiện thông qua chỉ số chịu hạn cũng phù hợp với kết quả so sánh về chiều dài và trọng lượng khô của rễ và thân như đã phân tích ở trên. Như vậy, từ kết quả phân tích hình thái và chỉ số chịu hạn có thể kết luận rằng, các dòng lúa được chuyển gen chịu hạn này thực sự có ý nghĩa. Trong thí nghiệm tương tự cho thấy dòng cây chuyển gen *hal* cho kết quả chịu hạn tương đối tốt so với cây đối chứng không chuyển gen, chứng tỏ gen *hal* có liên quan đến tính chịu hạn. Đặc biệt, hai dòng được chuyển gen OAT 10.1 và 3TPS 32.5 có khả năng chịu hạn tốt nhất.

Kết luận

1. Biểu hiện về hình thái của các dòng cây chuyển gen trong quá trình sinh trưởng và phát triển không có gì khác biệt so với cây không chuyển gen.
2. Dòng cây chuyển gen *hal* có khả năng chịu hạn tốt hơn so với đối chứng không chuyển gen chứng tỏ gen *hal* có liên quan đến tính chịu hạn ở lúa.
3. Các dòng cây chuyển gen 3TPS 32.5, 4OAT 10.1, 3H19.1, 4OAT 12.1 có khả năng chịu hạn tốt hơn so với cây không chuyển gen. Hai dòng cây chuyển gen 3TPS32.5, 4OAT 10.1 có khả năng chịu hạn tốt nhất thể hiện ở sự phát triển của bộ rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, trọng lượng tươi, khô của rễ và thân.

ii) Đánh giá tính chịu mặn

Về hình thái: Các dòng cây chuyển gen thử nghiệm trồng trong đất nhiễm mặn ở nồng độ 100mM, 150mM, 200mM NaCl không có biểu hiện hình thái gì khác lạ.

Thời gian sinh trưởng: 109 - 115 ngày.

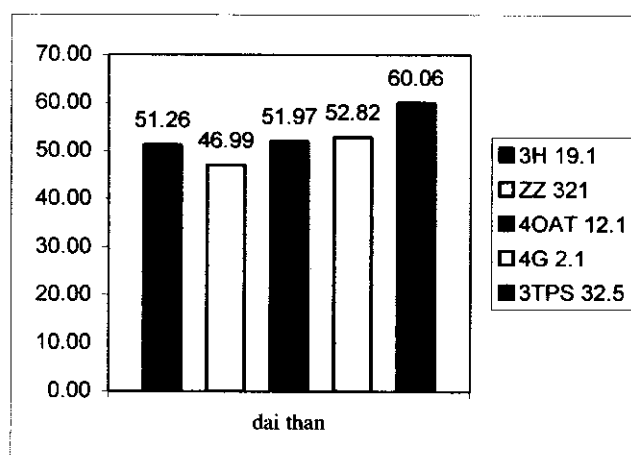
Trong thí nghiệm này chúng tôi xử lý ở 3 nồng độ 100mM, 150mM, 200mM NaCl, qua quan sát và thực tế cho thấy ở thậm chí ở nồng độ xử lý 200mM NaCl các cây lúa thí nghiệm vẫn có khả năng sinh trưởng và phát triển do vậy ở đây chúng tôi chỉ đi sâu vào phân tích các chỉ số nghiên cứu của cây chuyển gen và không chuyển gen ở nồng độ xử lý 200mM NaCl.

Kết quả các chỉ tiêu theo dõi được thể hiện ở Bảng 54.

Bảng 54. Chỉ số trung bình các chỉ tiêu của cây xử lý mặn

Tên dòng	Dài thân (cm)	TL hạt/cây (g)	Tích lũy chất khô/cây (g)
3TPS 32.5	60.06	1.05	1.76
4OAT 12.1	51.97	0.83	1.46
3H 19.1	51.26	0.74	1.38
ZZ 321	46.99	0.80	1.32
4G 2.1	52.82	0.99	1.65

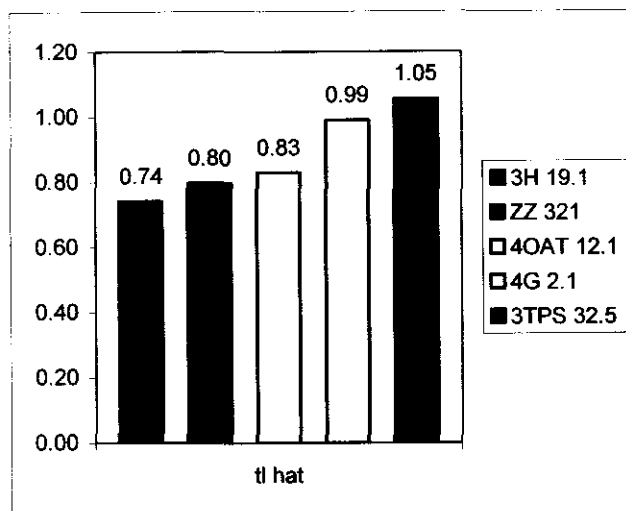
Kết quả thu được ở Bảng 54 cho thấy, các dòng chuyển gen đều có chiều dài thân vượt trội so với cây ZZ 321 không chuyển gen trong đó, dòng 3TPS 32.5 có chiều dài thân cao nhất. Biến động chiều dài thân được thể hiện ở Hình 102.



Hình 102. Biến động chiều dài thân ở các dòng

Số nhánh/bông ở các dòng chuyển gen và không chuyển gen ít dao động. Xét khả năng tích lũy chất khô, cả 3 dòng cây chuyển gen đều đạt chỉ số cao hơn cây không chuyển gen, dòng 3TPS 32.5 đạt chỉ số cao hơn hẳn so với dòng đối chứng (+). Đặc biệt phân tích chỉ tiêu trọng lượng hạt đây là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá năng suất cho thấy các dòng chuyển gen 3TPS 32.5, 4OAT 12.1 có chỉ số cao hơn, dòng 3TPS là dòng đạt chỉ số cao nhất hơn cả với đối chứng (+), riêng dòng 3H 19.1 có trọng lượng hạt đạt thấp hơn so với cây không chuyển gen. Mức

độ biến động trọng lượng hạt của các dòng cây chuyển gen sau khi xử lý mặn được thể hiện ở Hình 103.



Hình 103. Biến động trọng lượng hạt ở các dòng

Từ các kết quả và phân tích ở trên chúng tôi đi đến kết luận: Hai dòng lúa chuyển gen 3TPS 32.5 và 4 OAT 12.1 có khả năng chịu mặn cao hơn so với dòng ZZ 321 không chuyển gen. Trong điều kiện nhiễm mặn ở nồng độ 200mM NaCl các cây lúa chuyển gen này cho biểu hiện sinh trưởng phát triển bình thường, không xuất hiện đặc tính khác lạ. Các chỉ tiêu về chiều cao cây, số nhánh/bông, trọng lượng hạt, tích lũy chất khô đạt cao hơn so với cây không chuyển gen. Đặc biệt dòng 3TPS 32.5 có các chỉ tiêu phân tích đạt cao nhất, cao hơn cả đối chứng (+), đây là dòng cây chuyển gen có triển vọng nhất.

* Chúng tôi đồng thời tiến hành đánh giá tính chịu hạn hạt T_1 của các dòng lúa *indica* C71 chuyển gen *nha* A và DR2 chuyển gen *oat* đã kiểm tra Hygromycine 50mg/l (+) và PCR(+). Kết quả sau khi đánh giá tính chịu hạn thu được 6 dòng cây DR2 chuyển gen *oat*: 16.3, 35.1, 10.2, 36.2, 11.2, 35.2 và 02 dòng cây C71 chuyển gen *nha* A: 72, 137 có khả năng chịu hạn tốt.

Sau khi kết thúc 30 chu kỳ xử lý hạn, các dòng cây có triển vọng chịu hạn tốt này được chuyển sang các xô đất trồng và chăm sóc bình thường và đã thu hạt T_2 .

3.6.4. Lai tạo để kiểm tra cây chuyển gen

Lai chéo giữa các dòng 3TPS 32.5, 3H 19.1, 4OAT12.1. Vào thời kỳ cây lúa chuyển gen ở giai đoạn làm đòng, khi 1/3 đòng nhú ra khỏi bẹ lá, tiến hành khử đực cho các cây dùng làm mẹ, thời gian khử đực từ 17h-20h30. Tiến hành lai vào ngày hôm sau (thời gian từ 11h-13h) khi hoa ở các cây dùng làm đòng mẹ nở.

Thí nghiệm lai được tiến hành 5 đợt. Mỗi đợt tiến hành lai 15-20 bông/ 1dòng.

Tiến hành lai 5 đợt vào thời kỳ cây lúa làm đồng mỗi đợt tiến hành lai 15 bông/1 dòng. Kết quả lai lúa được trình bày ở Bảng 55 như sau:

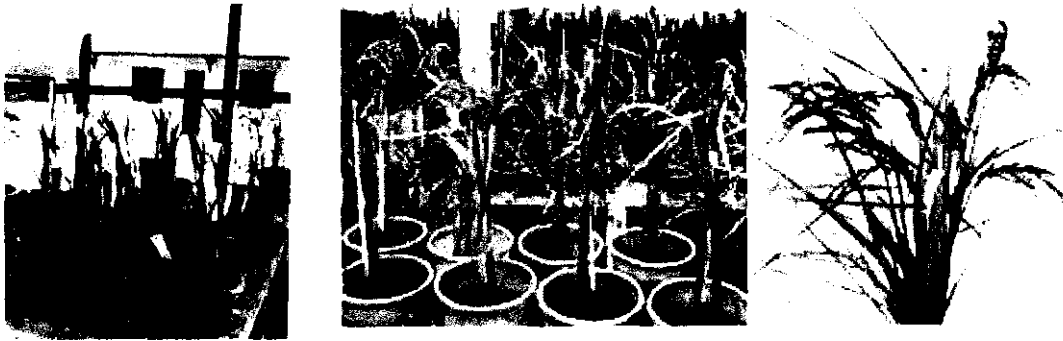
Bảng 55. Số lượng hạt lai thu được

Bố Mẹ	4OAT12.1/ 1/1	4OAT12.1/ 2	4OAT12.1/ 5	4OAT12.1/ 7	3H19.1/1	3H19.1/4	3H19.1/9	3H19.1/11	3TPS32.5/ 1	3TPS32.5/ 4	3TPS32.5/ 6
4OAT12.1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-
4OAT12.1/5	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-
4OAT12.1/7	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-
3H19.1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
3H19.1/4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
3H19.1/11	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
3TPS32.5/1	-	-	-	-	1	-	4	-	-	-	-
3TPS32.5/4	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
3TPS32.5/6	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-): Phép lai không thu được hạt lai

Bảng 56. Một số chỉ tiêu thu được từ cây lúa lai

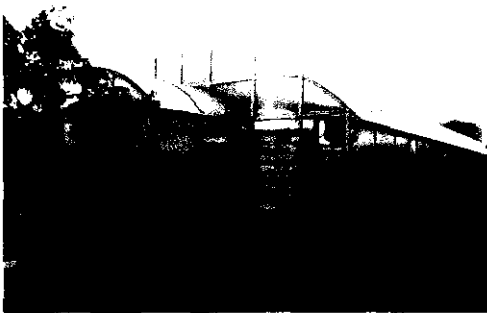
Nguồn gốc		Cây số	Số hạt	Số hạt nảy mầm	Số cây /Số nhánh		Số lượng hạt
Bố	Mẹ						
4OAT 12.1/7	3H 19.1/4	1	1	0			
3H 19.1/11	4OAT 12.1/5	2	7	1	1		236
3H19.1/1	3TPS 32.5/4	3	1	1	5		274
3H 19.1/4	3TPS 32.5/6	4	2	0			
3H19.1/9	4OAT 12.1/7	5	9	2	7		308
3TPS 32.5/1	4OAT 12.1/2	6	4	3	1	3	181
					2	4	286
					3	4	183
3TPS 32.5/4	3H19.1/1	7	2	1	6		421
3TPS 32.5/6	3H 19.1/11	8	2	2	1	7	368
					2	4	136
4OAT 12.1/1	3TPS 32.5/4	9	1	0			
3H19.1/1	3TPS 32.5/1	10	1	1	7		424
4OAT 12.1/5	3H 19.1/11	11	2	1	7		364
4OAT 12.1/2	3H 19.1/4	12	1	1	7		404
3H 19.1/9	3TPS 32.5/1	13	4	4	1	3	171
					2	3	142
					3	3	193
					4	3	94



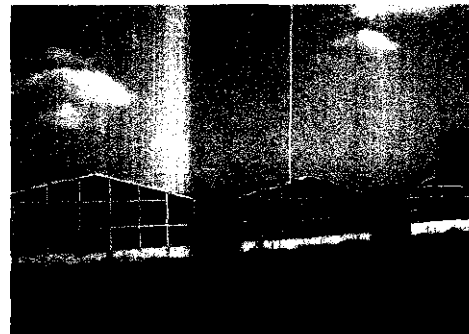
Hình 104. Cây lúa lai

Kết quả thu hạt lai F_1

Hạt lai thu được đã được trồng trong nhà lưới và thu hạt thế hệ 1 phục vụ cho các phân tích tiếp theo.



Hình 105. Nhà kính ở Trại Thực nghiệm Sinh học Cổ Nhuế, Hà Nội bảo đảm kín côn trùng để thử nghiệm và lai tạo cây trồng chuyển gen.



Hình 106. Nhà lưới ở Trại Thực nghiệm Sinh học Cổ Nhuế, Hà Nội bảo đảm kín côn trùng để thử nghiệm và lai tạo cây trồng chuyển gen.

3.6.5. Kết luận về đánh giá cây chuyển gen

1. Có 5 phương pháp nhận biết cây chuyển gen tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu: (i) ở dạng hạt có thể cho nảy mầm trên môi trường chứa kháng sinh; (ii) Là cây mầm từ hạt có thể nuôi cấy mô trên môi trường có chứa kháng sinh; (iii) ở dạng cây non có thể thử tính kháng kháng sinh trực tiếp trên lá; (iv) nếu mang gen kháng kanamycin có thể tiến hành ELISA bằng bộ kit bán sẵn và (v) thông qua lai Western với kháng thể đặc hiệu để tìm sản phẩm mang gen *cry* khi dự đoán là gen kháng sâu từ *Bt*.

2. Các dòng cây chuyển gen khi qua các pháp thử đều dương tính thì được kiểm tra tính kháng ở qui mô nhà kính, nhà lưới. Qui trình thử tính kháng rầy nâu, tính kháng sâu đục thân, sâu ăn lá, tính kháng hạn và tính chịu muối đã được xây dựng để kiểm tra biểu hiện tính kháng của các dòng cây chuyển gen thu được.

3. Bằng nguồn kinh phí khác đã hình thành được cơ sở gồm 01 nhà kính và 03 nhà lưới bảo đảm kín đối với côn trùng tại Trại Thực nghiệm Sinh học Cổ Nhuế để triển khai thử tính kháng và lai tạo cây trồng chuyển gen.

3.7. CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ QUI TRÌNH ĐÁNH GIÁ AN TOÀN SINH HỌC CÂY CHUYỂN GEN KHÁNG CÔN TRÙNG

3.7. Cơ sở khoa học và qui trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng

3.7.1. Cơ sở khoa học, thực tiễn và xã hội học của việc đánh giá an toàn sinh học đối với GMO

3.7.1.1. Giới thiệu về gen kháng côn trùng

3.7.1.2. Tổng quan về đánh giá an toàn sinh học của gen kháng côn trùng

3.7.2. Cơ chế quản lý rủi ro

3.7.3.1. Quy mô phòng thí nghiệm

3.7.3.2. Quy mô nhà kính

3.7.3.3. Quy mô đồng ruộng

3.7.3. Các thử nghiệm đồng ruộng

3.7.4. Kết luận

3.7.1. Cơ sở khoa học, thực tiễn và xã hội học của việc đánh giá an toàn sinh học đối với GMO

Theo dự đoán dân số thế giới sẽ tăng gấp đôi vào năm 2050. Tại châu Á, người ta hi vọng đến năm 2010 nhu cầu thực phẩm sẽ được đáp ứng tốt hơn. Điều này đã đặt ra một thách thức lớn đối với từng quốc gia. Công nghệ biến đổi di truyền là một chiến lược hiện đại nhiều triển vọng và chính xác nhất để tăng sản lượng lương thực toàn cầu bằng cách giảm thất thoát mùa màng và tăng năng suất trong khi vẫn giữ nguyên đất trồng trọt.

Tuy nhiên, khi các sinh vật biến đổi di truyền (Genetically Modified Organisms-GMOs) được đưa vào nông nghiệp với nguy cơ ngày càng lớn thì chính phủ nhiều nước trên thế giới đều có chung một mối quan tâm, đó là ảnh hưởng trước mắt và hệ quả lâu dài của việc sử dụng các GMO trong thực phẩm cho người và vật nuôi trong công nghiệp chế biến thực phẩm trong y tế và bảo vệ môi trường sống.

Các kết luận của giới khoa học cũng còn mâu thuẫn đặc biệt còn chưa đủ thời gian để kết luận ảnh hưởng lâu dài của các GMO đối với sức khỏe của con người và môi trường. Giới hạn của đề tài, tôi xin đi sâu trình bày cơ sở phương pháp đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng sâu.

Cơ sở đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng côn trùng đã được nhiều phòng thí nghiệm ở nhiều nước rất quan tâm nghiên cứu. Và chúng ta có thể vận dụng các kết quả nghiên cứu hay tham khảo các kết quả này vào điều kiện thực tế ở nước ta. Tuy nhiên, hiện nay ở nước ta vấn đề xây dựng khung pháp lý về ATSH nhằm đánh giá an toàn sinh học của các cây trồng chuyển gen

nói riêng và các sinh vật biến đổi gen nói chung là rất cần thiết và cấp bách. Việc đánh giá, quản lý rủi ro cần được thực hiện để đảm bảo an toàn cho con người và môi trường sống. Nhìn chung, vấn đề này cũng đang còn rất nhiều các ý kiến tranh luận của các chuyên gia. Trong điều kiện nước ta và trong giới hạn đề tài KC04.13 chúng tôi xin đưa ra một số tổng quan về đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng tạo cơ sở lý thuyết cho các bước đánh giá ATSH cho cây trồng chuyển gen sau này.

3.7.1.1. Giới thiệu về gen kháng côn trùng

- Giới thiệu về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Bt là trực khuẩn sinh bào tử, hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, gram (+). Nhiệt độ sinh trưởng cao nhất của *Bt* là 35 - 45°C và thấp nhất là 15 - 20°C. Kích thước tế bào dài 3-6µm có phủ tiêm mao không dày, chuyển động được, tế bào đứng riêng rẽ hoặc xếp thành chuỗi. Bào tử có dạng hình trứng dài 1,6µm-2µm, có thể nảy mầm thành tế bào sinh dưỡng khi gặp điều kiện thuận lợi. Tinh thể protein còn được gọi là "thể kèm bào tử", có nhiều hình dạng khác nhau như: hình vuông, chữ nhật, quả trám, ô van, lập phương kích thước 0,6x2 µm hình quả trám 6 mặt. Ngay cả trong cùng một chủng đôi khi cũng xuất hiện tinh thể dưới nhiều dạng khác nhau.

Bt có khả năng sản sinh protein tinh thể độc ở dạng ngoại bào (β , α , γ - exotoxin) và nội bào (δ - endotoxin). Trong các protein tinh thể độc, δ - endotoxin là một họ protein tinh thể độc chính gây độc hệ tiêu hoá của côn trùng. Trong các loại độc tố, thì δ -endotoxin, β -exotoxin là các độc tố được nghiên cứu nhiều nhất về mặt phân tử và phổ tác dụng với côn trùng, chúng tác dụng hầu hết lên các loại côn trùng thuộc Bộ Cánh vẩy (Lepidoptera), Hai cánh (Diptera), Cánh cứng (Coleoptera) và Tuyến trùng (Nematoda). Các protein có hoạt tính diệt côn trùng được tổng hợp trong suốt pha sinh trưởng muộn của vi khuẩn và được tích lũy dưới dạng tinh thể, dạng thể vùi trong tế bào chất, hoặc được tiết vào trong môi trường nuôi cấy

- Cơ chế tác động

Sau khi xâm nhập vào các ấu trùng của côn trùng đích qua đường tiêu hoá, protein *Bt* được hoạt hoá dưới tác động của môi trường kiềm trong ruột côn trùng, liên kết với các thụ thể và chọc thủng ruột giữa gây nên sự tổn thương làm chúng ngừng ăn. Kết quả là côn trùng chết sau một vài ngày.

Với khả năng sản sinh protein độc tố có khả năng diệt côn trùng, *Bt* đã và

đang được rất nhiều nhà khoa học nghiên cứu và khám phá giá trị nông học của chúng. Đến nay, hơn 200 loại protein của *Bt* đã được phát hiện với các nồng độ độc tố diệt một số loài côn trùng khác nhau.

3.7.1.2. Tổng quan về đánh giá an toàn sinh học của gen kháng côn trùng

Đánh giá an toàn sinh học là quá trình kiểm định một cách khoa học về các tác hại tiềm tàng của một GMO đối với sức khỏe môi trường, con người và động vật. Đây cũng là nhân tố duy nhất để đánh giá xem một GMO hoặc một sản phẩm có được cấp phép cho sử dụng hoặc nghiên cứu. Tuy nhiên, việc đánh giá tính an toàn là kết quả tổng hợp các quá trình đưa ra quyết định giữa các chính sách của quốc gia về nông nghiệp, CNSH và ATSH, các văn bản thoả thuận quốc tế, lợi ích của các bên liên quan và thái độ của dư luận. Các khía cạnh ATSH của GMOs cần được xem xét bao gồm: rủi ro, lợi ích, hiệu quả, giải phóng vào môi trường...

a. Các định nghĩa

- **Sinh vật biến đổi gen** là các thực vật, động vật, vi sinh vật mang một tổ hợp mới vật chất di truyền (ADN) nhờ sử dụng công nghệ sinh học hiện đại.

- **Thực phẩm chuyển gen** là thực phẩm do các sinh vật đã được biến đổi gen và sản phẩm của chúng tạo ra.

- **An toàn sinh học (Biosafety)** là thuật ngữ chỉ các quy định của cộng đồng nhằm đánh giá và phòng ngừa các rủi ro (Risks) do việc đưa vào sản xuất và tiêu thụ các sinh vật được biến đổi di truyền (Genetically Modified Organisms-GMOs)

An toàn sinh học đảm bảo tính an toàn trong hoạt động nghiên cứu, phát triển, chuyển giao, triển khai, sử dụng, đánh giá, quản lý rủi ro của các sinh vật đã bị biến đổi gen và sản phẩm của chúng. Tuy nhiên, chúng có thể có ảnh hưởng bất lợi đối với bảo tồn và sử dụng bền vững đa dạng sinh học cũng như những rủi ro đối với môi trường và sức khỏe con người.

b. Đánh giá rủi ro đối với môi trường

Các vấn đề lo ngại chính về tác động của các sinh vật chuyển gen (GMOs) tự nhiên cũng như các loài khác. Hậu quả là gây nên sự thay đổi các mối quan hệ sinh thái hoặc các nhân tố vô sinh và hữu sinh ở hệ sinh thái có GMOs. Như vậy, nguồn gốc của những lo lắng trên là bắt nguồn từ mối hiểm họa về đa dạng sinh học của các nơi sản xuất GMOs.

- Nước ngầm và hệ sinh thái đất

Protein *Bt* tồn tại tương đối bền trong đất và được phân loại như là dạng bất

động vì chúng không có khả năng di chuyển hoặc thấm qua nước ngầm. Các protein không bền vững trong điều kiện đất axit. Khi phơi dưới ánh nắng mặt trời, chúng bị phân huỷ nhanh chóng dưới tác động của tia UV.

Các chuyên gia đã tiến hành những nghiên cứu độc lập nhằm điều tra các ảnh hưởng của cây trồng *Bt* đối với sinh vật đất và các loài côn trùng khác được xem là có ích trong nông nghiệp. Kết quả cho thấy, chúng không gây ra ảnh hưởng bất lợi nào đối với các sinh vật đất không phải là đích tấn công của chúng, thậm chí ngay cả khi các sinh vật này được xử lý *Bt* với liều lượng cao hơn nhiều so với thực tế có thể xảy ra trong điều kiện trồng trọt tự nhiên. Tương tự, nghiên cứu của US-EPA cũng cho thấy không có sự thay đổi nào trong quần thể vi sinh vật đất giữa các cánh đồng có nguyên liệu thực vật *Bt* và cánh đồng có nguyên liệu thực vật truyền thống (Donegan và cộng sự, 1995), cũng như không quan sát thấy sự khác biệt giữa các cánh đồng trồng cây *Bt* và cây không chuyển gen *Bt* (Donegan và cộng sự, 1996).

- Động vật và côn trùng

Các thử nghiệm tiến hành trên chó, chuột lang, thỏ, cá, ếch, kỳ giông và chim cho thấy protein *Bt* không gây ra những ảnh hưởng có hại. Cũng cần nhấn mạnh rằng, độc tố cũng hoàn toàn không gây ảnh hưởng đến các loài côn trùng có ích hoặc động vật ăn thịt như ong mật và bọ cánh cứng (Extoxnet, 1996).



Hình 107. Bướm Monarch sinh trưởng và phát triển bình thường

Năm 1999, có một báo cáo về ảnh hưởng có hại của hạt phấn từ cây ngô *Bt* đến ấu trùng của loài bướm Monarch. Báo cáo này đã gây ra mối quan tâm và lo ngại về những rủi ro mà thực vật *Bt* có thể gây ra đối với sinh vật không cần diệt. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy ngô *Bt* gây ảnh hưởng không đáng kể đối với quần thể bướm Monarch trên cánh đồng. Nỗ lực nghiên cứu hợp tác giữa các nhà khoa học Hoa Kỳ và Canada đã cung cấp những thông tin để xây dựng quá trình đánh giá rủi ro tiêu chuẩn về ảnh hưởng của ngô *Bt* đối với quần thể bướm Monarch. Họ đi đến kết luận rằng, hầu hết các giống lai thương mại, protein *Bt* được biểu hiện với nồng độ rất thấp trong hạt phấn và nghiên cứu

trong phòng thí nghiệm cũng như trên cánh đồng cho thấy mọi mật độ hạt phấn đều không gây ảnh hưởng có hại trên cánh đồng.

- Phát triển tính kháng của côn trùng

Một lo ngại khác về thực vật *Bt* là sự phát triển tính kháng của côn trùng đối với *Bt*. Chính phủ, Bộ ngành và các nhà khoa học đã đưa ra các kế hoạch quản lý tính kháng của côn trùng để giải quyết vấn đề này. Những kế hoạch này bao gồm một qui định rằng mọi cánh đồng trồng cây chuyển gen kháng côn trùng phải có cả cây không chuyển gen để côn trùng phát triển mà không bị chọn lọc đối với những giống kháng sâu. Những biện pháp quản lý tính kháng khác cũng đang được các nhà khoa học trên khắp thế giới xây dựng.

Trước khi đưa ra thị trường, GMCs được đánh giá cẩn thận về ảnh hưởng tới môi trường. Chúng được các nhà chức trách đánh giá tuân theo các quy tắc do các chuyên gia môi trường trên khắp thế giới đưa ra (như của Hội đồng nghiên cứu quốc gia Mỹ năm 1989; Tổ chức hợp tác phát triển kinh tế năm 1992; Chính phủ Canada năm 1994). Những người đánh giá ảnh hưởng của cây chuyển gen gồm những người tạo ra chúng, các cơ quan kiểm soát và các nhà khoa học.

Hầu hết các quốc gia sử dụng các quy trình đánh giá tương tự để xem xét sự tương tác giữa GMCs và môi trường. Bao gồm những thông tin về vai trò của gen được đưa vào, ảnh hưởng của nó đối với cây nhận gen, đồng thời cả những câu hỏi cụ thể về ảnh hưởng không mong muốn như:

- ảnh hưởng lên các sinh vật không phải là sinh vật cần diệt trong môi trường đó.
- cây chuyển gen có tồn tại trong môi trường lâu hơn bình thường hoặc xâm chiếm những nơi cư ngụ mới không?
- khả năng gen phát tán ngoài ý muốn từ cây chuyển gen sang loài khác và những hậu quả có thể.

Ngoài những đánh giá cẩn thận về ảnh hưởng tới môi trường, đồng thời cũng cần quản lý rủi ro và xây dựng các hệ thống nông nghiệp tốt để phát hiện và giảm thiểu những mối nguy hại có thể xảy ra.

c. Đánh giá rủi ro đối với sức khỏe con người và an toàn lương thực

Mối lo ngại lớn nhất đối với thực phẩm GMOs là những protein mới tạo ra có thể gây độc hoặc gây dị ứng. Ngoài ra, còn các nguy cơ khác như giảm nồng độ một số chất dinh dưỡng trong khi lại tăng nồng độ một số chất khác.

- Ảnh hưởng đến sức khỏe con người

Protein *Bt* có an toàn đối với các sinh vật không cần diệt? Tính đặc hiệu của độc tố *Bt* đối với côn trùng đích là một trong những tính trạng khiến *Bt* trở thành thuốc trừ sâu sinh học lý tưởng. Trên thực tế, các chủng *Bt* khác nhau sản sinh ra các protein độc đối với một số loài côn trùng nhất định. Độc tố của protein *Bt* tương tác trực tiếp với thụ quan. Có nghĩa là đối với những côn trùng bị ảnh hưởng bởi protein *Bt*, trong ruột chúng phải có các vị trí thụ quan đặc trưng để protein có thể kết bám. May mắn là người và đại đa số các côn trùng có ích không có các thụ quan này.

Trước khi được đưa ra thị trường, cây trồng *Bt* phải trải qua rất nhiều thử nghiệm quản lý nghiêm ngặt trong đó bao gồm các nghiên cứu độc tính và khả năng gây dị ứng.

Cục Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (US Environmental Protection Agency – US-EPA) đã triển khai các đánh giá độc tố và các protein *Bt* thậm chí đã được thử ở liều lượng cao hơn. Theo Extension Toxicology Network (Exttoxnet), các dự án về thông tin thuốc trừ sâu ở một số trường đại học của Hoa Kỳ cho thấy “Kết quả cuộc thử nghiệm trên 18 người mỗi ngày ăn 1 gram *Bt* thương mại trong vòng 5 ngày, và trong các ngày khác nhau... không gây ra chứng bệnh gì. Những người ăn 1 gram *Bt*/ ngày trong 3 ngày liên tục hoàn toàn không bị ngộ độc hay nhiễm bệnh”. Hơn nữa, ở mức phân tử protein nhanh chóng bị phân huỷ bởi dịch vị dạ dày (trong điều kiện phòng thí nghiệm) (Exttoxnet, 1996).

- Sự kháng kháng sinh:

Kháng sinh là các hợp chất hoá học có khả năng diệt vi khuẩn có hại. Đa số chúng là các cơ chất tự nhiên do các vi khuẩn và nấm mốc tạo ra trong quá trình cạnh tranh dành môi trường sống. Trong tự nhiên, các vi khuẩn hình thành khả năng kháng chất kháng sinh do các vi khuẩn khác tạo ra để tồn tại. Khả năng này rất đặc thù và được kiểm soát bởi các gen kháng kháng sinh.

Trong công nghệ sinh học thực vật, các gen kháng kháng sinh được sử dụng để tạo khả năng kháng một kháng sinh đặc hiệu cho các mô thực vật, do vậy dễ dàng chọn lọc các mô. Các nhà khoa học sử dụng tính trạng này như một tác nhân chọn lọc để nhận biết ra những tế bào đã chuyển được gen vào.

Mối quan tâm trong việc sử dụng gen chọn lọc này là việc dùng nó có thể dẫn đến khả năng kháng kháng sinh trong các quần thể vi khuẩn. Ngày càng có nhiều lo lắng rằng các gen chỉ thị này có thể được truyền từ các cây trồng chuyển gen

sang các vi sinh vật cư trú trong ruột người và làm chúng tăng khả năng đề kháng đối với kháng sinh. Đến nay đã có rất nhiều các nghiên cứu và thử nghiệm khoa học về vấn đề này để đi tới các kết luận sau:

- Khả năng các gen kháng kháng sinh có thể được chuyển từ các cây trồng chuyển gen sang các sinh vật khác là vô cùng nhỏ;
- Thậm chí khi một gen kháng kháng sinh được chuyển sang một sinh vật khác thì tác động của việc này cũng không đáng kể do các loại kháng sinh được sử dụng trong GMCs ít được ứng dụng trong thú y và y học.

Mức độ an toàn của các gen kháng kháng sinh chọn lọc đã được các tổ chức quốc tế như OECD, WHO và FAO xem xét sau một quá trình đánh giá toàn diện trong nhiều năm. Tuy vậy, để làm dịu những lo lắng của xã hội, các nhà khoa học tại một vài quốc gia đang nghiên cứu để thiết kế những gen chỉ thị mới nhằm loại các gen kháng kháng sinh chọn lọc khỏi những sản phẩm hiện nay.

- Vấn đề cỏ dại

Khái niệm cỏ dại (weediness) không phải là đặc tính di truyền của một số loài thực vật nhất định và thường được đánh giá tùy thuộc thời điểm và hoàn cảnh nhất định theo ý muốn chủ quan của con người. Do đó cỏ dại được định nghĩa một cách đơn giản là một loài thực vật sinh trưởng tại những nơi không mong muốn.

Trên các cánh đồng, một giống GMO có thể coi là vật gây hại hay cỏ dại khi nó tiếp tục sinh trưởng ở các vụ sau và cạnh tranh với các cây chính vụ. Nếu giống thực vật này được biến đổi di truyền để chống chịu các loại thuốc diệt cỏ thì vấn đề cỏ dại rất khó được kiểm soát và cần phải chuẩn bị các biện pháp, thuốc diệt cỏ thay thế. Tuy nhiên, thông thường các giống cây lương thực đã được thuần hóa đến mức chỉ có khả năng sinh sống trên các cánh đồng đã được canh tác thích hợp nên khả năng trở thành một loài thực vật gây hại là không lớn.

Tóm lại, nguy cơ gây tác hại đối với môi trường của một giống cây lương thực chuyển gen chỉ có thể xảy ra khi giống cây này có đủ khả năng di truyền để tồn tại và sinh trưởng ở một môi trường mới không được canh tác thích hợp. Do đó, mỗi nguy hại này chỉ thực sự xuất hiện đối với các loài cây chuyển gen có khả năng tự sinh sản và ít được thuần hóa như cỏ linh lăng, thông, dương, bạch đàn...

- Vấn đề dị ứng của protein lạ trong thực phẩm chuyển gen

Bất kỳ một sản phẩm chuyển gen nào trước khi được đưa ra thị trường phải được thử nghiệm toàn diện, được các nhà khoa học và các nhà đánh giá giám sát

độc lập xem có an toàn hay không về mặt dinh dưỡng, độc tính, khả năng gây dị ứng và các khía cạnh khoa học thực phẩm khác. Những đánh giá về an toàn thực phẩm này dựa trên những quy định của các tổ chức có thẩm quyền của mỗi nước và bao gồm: hướng dẫn sản phẩm, thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hoá sinh, độc tính, dinh dưỡng và khả năng gây dị ứng. Các câu hỏi điển hình có thể được đặt ra là:

- Các thực phẩm tạo ra từ cây trồng chuyển gen có an toàn hay không?
- Nồng độ các độc tố hay chất gây dị ứng trong thực phẩm có thay đổi hay không?
- Hàm lượng các chất dinh dưỡng chính có thay đổi hay không?
- Các chất mới trong thực phẩm GMOs có đảm bảo tính an toàn hay không?
- Khả năng tiêu hoá thức ăn có bị thay đổi hay không?
- Các quy trình được tạo ra nhờ các thực phẩm đã được chấp nhận hay không?

Ngay khi các câu hỏi về thực phẩm chuyển gen đã được trả lời, vẫn còn nhiều việc phải làm trong quá trình phê chuẩn trước khi thực phẩm chuyển gen được thương mại hoá. Về vấn đề an toàn thực phẩm GMOs: “Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với các thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với việc đánh giá các thực phẩm khác. Quá trình đánh giá an toàn thực phẩm chuyển gen mang lại tất cả các lợi ích như thực phẩm thông thường và không có thêm một tác hại nào”.

3.7.2. Cơ chế quản lý rủi ro

Vấn đề quản lý rủi ro trong CNSH nông nghiệp là việc áp dụng các quy trình và phương pháp để làm giảm các tác động có hại của một rủi ro xuống đến mức có thể chấp nhận được. Trong thực tế, khả năng kiểm soát được các rủi ro tiềm tàng hoặc đã xác định có thể áp dụng từ quá trình phát triển và thử nghiệm GMOs.

3.7.2.1. Quy mô phòng thí nghiệm

Bằng cách tuân thủ nghiêm ngặt các quy trình thí nghiệm và tiêu chuẩn ATSH, các cây trồng và tế bào chuyển gen có thể được kiểm soát trong PTN, các thiết bị nuôi cấy mô, và phòng nuôi trồng. Cây trồng có thể được quản lý tương đối dễ dàng trong điều kiện PTN với lưu ý đặc biệt về việc thu nhặt kỹ lưỡng hạt được tạo ra từ cây trong PTN hoặc phòng nuôi để loại bỏ hoặc phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Việc dán nhãn cẩn thận và chi tiết cũng hạn chế sự nhầm lẫn. Các

vật liệu cần loại bỏ thì phải tuân theo quy trình loại thải để bảo đảm GMO không thể tồn tại và phát triển bên ngoài PTN. Các phương pháp được sử dụng là khử trùng bằng áp suất, các dung dịch tẩy rửa có thành phần thích hợp.

3.7.2.2. Quy mô nhà kính

Các nhà kính được thiết kế để giữ các cây trồng ở bên trong cách ly với côn trùng và động, thực vật khác bên ngoài. Tùy thuộc mục đích thí nghiệm và đặc điểm GMOs liên quan đến các loại, mức độ ATSH khác nhau mà người ta tiến hành thiết kế nhà kính với các chi tiết và quy trình xây dựng phù hợp. Trong đa số trường hợp, các nhà kính thông thường có thể sử dụng để nuôi trồng GMOs bằng cách tân trang và nâng cấp hệ thống kính. Để đáp ứng các mức an toàn cao hơn, hệ thống nhà kính có thể được tăng cường với các thiết bị điều khiển và lọc luồng không khí đi vào và ra; hệ thống điều khiển và làm sạch nguồn nước ra, hệ thống khử trùng tại chỗ các vật liệu thực vật cần loại bỏ hoặc các thiết bị khác, hệ thống làm sạch nhà kính sau thí nghiệm, giới hạn số người có thể cho phép vào nhà kính, đào tạo và nâng cao kỹ thuật ATSH cho những nhân viên và nhà nghiên cứu. Đồng thời, các biện pháp phòng ngừa sự phát tán GMOs cũng cần được quan tâm trong quá trình vận chuyển GMOs vào hoặc ra nhà kính, giám sát sự phát tán GMOs trong và sau khi tiến hành thí nghiệm.

Các nhà kính hiện nay, kể cả các nhà kính hiện đại nhất cũng không ngăn cản hoàn toàn sự phát tán của hạt phấn. Việc phòng ngừa sự phát tán của hạt phấn đòi hỏi các trang thiết bị chuyên biệt và rất đắt so với khả năng tài chính của hầu hết các Viện nghiên cứu trên thế giới. Một giải pháp đơn giản và hiện được sử dụng rộng rãi là treo các túi nhỏ bao lấy hoa đực của cây trước khi hạt phấn chín, các hạt phấn thu được sẽ dùng để giao phấn bắt buộc hoặc loại bỏ. Để phòng ngừa hiệu quả hơn, người ta có thể xây bên trong nhà kính một phòng nhỏ được bao kín làm nhiệm vụ giữ các hạt phấn phát tán trong không khí.

3.7.2.3. Quy mô đồng ruộng

Trước khi sản phẩm được đưa ra thị trường, GMCs thường được thử nghiệm ở quy mô đồng ruộng. Nghiên cứu thử nghiệm đồng ruộng nhằm xác định khi sản phẩm đưa vào sản xuất, tiêu thụ có những ảnh hưởng tác động gì. Đây là giai đoạn thu thập số liệu, hoàn thiện các phương pháp để thu nhận thông tin. Các nhà điều tra luôn luôn tiến hành đánh giá những ảnh hưởng đến quần thể sinh vật đích - ví dụ trong trường hợp GMCs có khả năng sản sinh độc tố thì quần thể sinh vật đích là côn trùng chịu tác động của độc tố này. Tuy nhiên, các nhà đánh giá rủi ro cần quan tâm đến quần thể sinh vật không phải là đích tấn công của

độc tố. Quần thể côn trùng này và cách thu thập số liệu được quy định trong các văn bản luật dưới sự giám sát của các cơ quan chính phủ. Trong các nghiên cứu đồng ruộng, thông tin có thể được thu thập một cách trực tiếp (ví dụ bao nhiêu ong hoặc côn trùng có ích khác bị giết) hoặc có thể gián tiếp...

3.7.3. Các thử nghiệm đồng ruộng

Hiện nay ở nước ta, các thử nghiệm đồng ruộng đối với cây bông chuyển gen Bt được tiến hành chủ yếu ở khu vực phía Nam. Thống kê trên các địa bàn trồng bông chính thuộc các Chi nhánh, trong vụ Mùa trồng bông nhờ nước trời, năm 2000, giống kháng sâu Bt mới chỉ được thử nghiệm, diện tích không đáng kể; đến năm 2001, diện tích đạt 795 ha, chiếm từ 0 - 10% ở các vùng; và sang năm 2002, diện tích tăng vọt đến 11.717ha, chiếm tỷ lệ từ 14,5 - 87% diện tích ở các vùng và tăng gấp 15 lần so với năm 2001. Nguyên nhân chủ yếu là do các giống bông kháng sâu và các giống bông lai đều kháng sâu cao với một số sâu hại chính trong nước, đồng thời khả năng kháng rầy xanh được cải thiện nhiều so với giống kháng sâu thường, cho năng suất cao và phẩm chất tốt.



Hình 108. Sâu cắn chồi ở bông



Hình 109. Cánh đồng bông chuyển gen Bt

Ở Việt Nam, chưa từng có văn bản pháp lí nào liên quan đến thử nghiệm các cây trồng chuyển gen ở quy mô đồng ruộng. Do vậy việc đánh giá rủi ro và quản lý rủi ro cũng chưa từng được triển khai. Tuy nhiên trong quá trình thử nghiệm này, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra tính kháng đối với các loài sâu hại khác và thiên địch, số liệu cho thấy các giống bông chuyển gen không có khả năng kháng đối với sâu xanh da láng, sâu khoang và cũng không ảnh hưởng đến các loài nhện bắt mồi sinh sống trên ruộng bông. Theo các nguồn tin không chính thức, tính kháng sâu của các giống bị giảm dần qua từng vụ với tỉ lệ thấp (quan sát sau 7 vụ).

Tại Trại sinh học Thử nghiệm Cổ Nhuế, Viện Công nghệ Sinh học theo nguồn vốn hỗ trợ ODA của Chính phủ Hoa Kỳ đã xây dựng hệ thống nhà kính,

nhà lưới và tiến hành thử nghiệm đồng ruộng ở qui mô nhỏ 250m² cây đu đủ chuyển gen kháng virus đốm vòng.



Hình 110. Thử nghiệm sinh học cây đu đủ chuyển gen kháng virus đốm vòng

3.7.4. Kết luận

Cây trồng Bt là công cụ diệt sâu bệnh thực vật mới đã được nghiên cứu rất kỹ về tính an toàn sinh học đối với môi trường cũng như sức khoẻ con người. Hiện nay, cây trồng Bt đã được trồng và thương mại hoá trên toàn cầu chủ yếu là ngô, bông và đậu tương. Vào năm 2003, diện tích trồng cây chuyển gen kháng sâu là 12,2 triệu hecta chiếm 18% diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn thế giới. Trong quy mô nhỏ của chuyên đề này chỉ ra các nghiên cứu, điều tra và cơ chế quản lý rủi ro về đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng sâu của các nhóm nghiên cứu khác nhau trên thế giới. Ở Việt Nam vấn đề quan trọng hơn cả là xây dựng và thực thi hướng dẫn và/hoặc quy chế ATSH. Xây dựng và thực thi quy chế ATSH cần được tiến hành trên cơ sở hợp tác với các chuyên gia quốc tế và trao đổi thông tin với các nước, đặc biệt là các nước có hệ sinh thái tương tự nhau.

CHƯƠNG 4

TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

Trong thời gian 36 tháng từ tháng 10/2001 đến hết tháng 10/2004, đề tài KC.04.13 đã thu được các kết quả sau:

4.1. KẾT QUẢ VỀ KHOA HỌC

01. Lần đầu tiên đưa các kỹ thuật phân lập gen như phân lập thông qua PCR và phân lập thông qua chức năng protein vào điều kiện phòng thí nghiệm Việt Nam để thực hiện nội dung sưu tập, phân lập và thiết kế gen. Kết quả là đã phân lập được gen *vip* diệt côn trùng cánh cứng, gen *Pi* kháng đạo ôn và thiết kế các gen *vip*, *Pi*, và gen *cry* vào các vector pCAMBIA, PBI121 đủ điều kiện để chuyển gen vào cây trồng.
02. Để chuyển gen vào 4 loại cây trồng khác nhau, đã có 11 quy trình công nghệ chuyển gen được hoàn thiện trên cơ sở các kỹ thuật chuyển gen tiên tiến đang được triển khai và hoàn thiện trên thế giới. Đó là 3 quy trình đối với bông vải; 1 quy trình đối với cây hồng; 1 quy trình đối với cây hoa cúc; và 5 quy trình đối với cây lúa. Sử dụng 5 loại gen có tính kháng sâu, kháng rầy nâu, chịu hạn và giữ hoa lâu tàn để chuyển vào các loại cây trồng nêu trên.
03. Trên đối tượng cây bông vải đã hoàn thiện qui trình chuyển gen qua ống phẩn bản vi tiêm, hoàn thiện ở qui mô nhỏ và đã triển khai ở qui mô rất lớn với 5000 cây bông của 6 loại giống gồm TM1, D16-2, LRA, C118, VN36P và 254 và hai nhóm gen gồm gen kháng sâu *cryIA(c)* và *cryIA(b)* và gen chịu hạn TPS và P5CS, kết quả thu được trên 217.000 hạt bông T₀ và sàng lọc được nhiều dòng có triển vọng sẽ được nghiên cứu tiếp.
04. Mục tiêu tái sinh cây bông vải qua nuôi cấy tế bào mô sẹo và tạo phôi soma lần đầu tiên đã được lập lại thành công tại phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học trên hai đối tượng là giống SSR và Cooker, mở ra triển vọng biến nạp nhiều loại gen vào 2 loại giống này để sau đó lai tạo với các giống đang sử dụng trong sản xuất đại trà.
05. Bằng cách hoàn thiện hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây qua cụm chồi đã có thể áp dụng kỹ thuật chuyển gen thông qua nuôi cấy mô đối với nhiều giống bông đang trồng đại trà, mở ra triển vọng to lớn khắc phục tình

trạng không tái sinh cây trong điều kiện *in vitro* ở đối tượng cây bông.

06. Trên đối tượng cây hông là cây trồng rừng mọc nhanh để tài đã hoàn thành các khâu xây dựng hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây, khâu biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn lọc cây chuyển gen. Kết quả là đã thu được những dòng cây hông sản sinh ra độc tố CRY giết sâu xanh ăn lá.
07. Hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây hoàn chỉnh trên đối tượng hoa cúc được hoàn thiện và đưa vào qui trình chuyển gen *anti-ACO* ức chế sinh tổng hợp enthylen làm cho hoa lâu tàn thu được các dòng cây chuyển gen dương tính thông qua lai phân tử Southern, đang chờ ra hoa để thử tác dụng giữ hoa lâu tàn.
08. Với cây lúa có 3 qui trình chuyển gen khác nhau được xây dựng: (1) chuyển gen nhờ súng bắn gen; (2) Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn dòng kinh điển bằng kháng sinh hygromycin và (3) Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn dòng bằng manose đảm bảo tạo ra cây chuyển gen „sạch“, không chứa gen kháng kháng sinh. Kết quả là đã thu được những dòng lúa kháng rầy nâu, kháng sâu đục thân và có khả năng chịu hạn thông qua chuyển các gen đặc dụng.
09. Về kỹ thuật đánh giá cây chuyển gen ở mức Phòng thí nghiệm và ở qui mô kiểm soát đã xây dựng được các kỹ thuật sinh lý như: nảy mầm hay cấy mô trên môi trường chứa kháng sinh, tạo vết cháy trên lá; sinh hoá như: thử ELISA, bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như: PCR, lai Southern, lai Northern và Western.
10. Các cây chuyển gen đang được trồng trong nhà kính an toàn côn trùng để thử sinh học hoạt tính gen, theo dõi hoạt động của gen chuyển và tính ổn định di truyền của chúng ở các thế hệ tiếp theo. Điều nổi bật là đã thông qua nguồn vốn khác xây dựng được hệ thống nhà kính, nhà lưới thử nghiệm cây trồng chuyển gen qui mô tổng cộng trên 400m².
11. Việc đánh giá an toàn sinh học mới chỉ dừng ở 2 mức: (1) là xây dựng phương pháp đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng sâu ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô nhà lưới; (2) là xây dựng cơ sở khoa học và qui trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng

12. Đề tài có 3 đề xuất về hướng sử dụng: (1) Có văn bản pháp lý để các loại gen được trao đổi, tạo điều kiện cho các phòng thí nghiệm trong nước có thể sử dụng vào mục đích nghiên cứu. (2) Nguyên liệu chuyển gen được sử dụng làm giống trực tiếp hay sẽ làm nguyên liệu tạo giống thông qua các phép lai hữu tính tiếp theo được các cơ quan nghiên cứu tạo và sản xuất giống cây trồng. (3) Quy trình công nghệ, tài liệu hướng dẫn dùng cho cơ sở nghiên cứu, cơ sở giảng dạy được thoả thuận giữa cơ quan chủ trì và cơ quan hoặc người sử dụng.

4.2. KẾT QUẢ NỔI BẬT VÀ KHẢ NĂNG ÁP DỤNG

Bảng 57. Báo cáo tóm tắt kết quả thực hiện từ 10/2001 - 10/2004

TT	Tên sản phẩm	Số lượng	Chỉ tiêu Kinh tế - kỹ thuật	Kết quả đạt được
1	Bộ sưu tập gen có ích	12	- Các chỉ tiêu biểu thị gen được chuyển nạp (tỷ phần gen cần chuyển, các gen đặc trưng) - Các chỉ tiêu an toàn sinh học	Hoàn thiện việc thiết kế các gen <i>cryIA/b</i> , <i>cryA/c</i> , <i>GNA</i> , <i>ACO</i> , <i>Pi-1</i> , <i>Pi-2I</i> , <i>vip</i> , <i>Xa21</i> , <i>OAT</i> , <i>TPS</i> , <i>P5CS</i> , <i>nhaA</i> .
2	Cây trồng được chuyển gen thành công, Thử nghiệm trong sản xuất. Thu dòng ổn định di truyền gen chuyển	4 loại 86 dòng Chưa có		Bốn loại cây trồng đã chuyển gen: Lúa, Bông Vải, Hoa cúc và Hồng. - 37 dòng lúa T_2 (giống lúa IR64) mang gen <i>cry</i> - 5 dòng lúa T_4 (C71) mang gen <i>cry</i> có tính kháng sâu đục thân cao - 6 dòng bông T_2 mang gen <i>cry</i> - 4 dòng cây Hồng mang gen <i>cry</i> 14 dòng Hoa cúc mang gen <i>ACO</i> 20 dòng Hoa cúc mang gen <i>cry</i> Các dòng Lúa và Bông vải T_2 mang gen <i>cry</i> - 27 dòng lúa T_2 (giống lúa IR64) mang gen <i>cry</i> - 1 dòng lúa T_4 (C71) mang gen <i>cry</i> có tính kháng sâu đục thân cao
3	Công nghệ chuyển gen cho cây trồng Việt Nam			- Chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm đối với cây Bông - Chuyển gen thông qua <i>Agrobacterium</i> đối với cây Lúa, cây Hồng và Hoa cúc

Đề tài đã hoàn thành tốt các hạng mục công việc như đã ký trong Hợp đồng số 13/2001/HĐ-ĐTCT-KC04.13 cho năm 2004, cụ thể như sau:

1. Đã phân lập được các gen *vip* có phổ diệt côn trùng rất rộng và thiết kế thành công các gen này vào vector chuyển gen pBI121 để phục vụ công tác chuyển gen vào các đối tượng cây trồng đặc biệt là cây bông vải.
2. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh ở cây

bông vải từ phôi soma.

3. Hoàn thiện quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* vào hầu hết các đối tượng cây trồng của đề tài (cây lúa, cây hoa cúc và cây Hồng).
4. Xây dựng quy trình chuyển gen ở cây bông vải bằng phương pháp vi tiêm vào bầu noãn.
5. Kết quả đề tài đã nhận được 4 loại cây trồng chuyển gen vượt kế hoạch so với đăng kí trong hợp đồng là một loại và nhận được 28 dòng lúa chuyển gen T_2 , và T_4 tương đối ổn định về mặt di truyền.
6. Làm chủ được các phương pháp chẩn đoán cây chuyển gen: PCR, lai Southern, Northern, Western, Elisa, thử kháng sinh, thử tính kháng hạn, kháng mặn và kháng sâu của các dòng chuyển gen.

4.3. TRÌNH ĐỘ CÔNG NGHỆ

- Trình độ công nghệ về phân lập, thiết kế gen và chuyển gen vào thực vật đã đạt trình độ quốc tế.
- Lần đầu tiên ở Việt Nam đã hoàn thiện phương pháp tái sinh cây bông vải thành công từ phôi soma tiến tới phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây bông vải thông qua *Agrobacterium*
- Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen đã đạt trình độ quốc tế, số liệu, hình ảnh, bảng đáng tin cậy.
- Các kết quả nghiên cứu thu được đã khẳng định trình độ của các cán bộ khoa học nước ta trên lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại ngang tầm với các nước trong khu vực và thế giới. Các kết quả thu được vừa có ý nghĩa khoa học và vừa có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc cải tiến giống cây trồng.

4.4. KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG

Bảng 58. Khả năng ứng dụng của đề tài

TT	Tên tiến bộ kỹ thuật	Cơ quan tạo ra	Nơi được chuyển giao	Hiệu quả kinh tế	Pháp lý cho việc áp dụng
1	Các gen và các vector chuyển gen	Viện Công nghệ Sinh học	- Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Chuyển gen có ích vào cây trồng nhằm nâng cao sức chống chịu sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi	Sẽ đăng ký quyền tác giả
2	Công nghệ chuyển gen	Các Viện	- Các Sở KH-CNMT các tỉnh - Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Tạo giống cây trồng chuyển gen	
3	Quy trình nuôi cấy mô tái sinh cây bông, cây Hồng, cây Hoa cúc, cây lúa	Các Viện	- Các Sở KH-CNMT các tỉnh - Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Sử dụng cho công nghệ chuyển gen và nhân nhanh cây	Sẽ đăng ký quyền tác giả
4	Dòng cây chuyển gen kháng sâu	Các Viện	Cơ quan tạo giống cây trồng	Lai tạo giống chống chịu sâu bệnh	Sẽ đăng ký quyền tác giả
5	Phương pháp phân tích cây chuyển gen	Các Viện	Các phòng thí nghiệm quan tâm	Chuyển giao công nghệ	

4.5. ĐÀO TẠO

Bảng 59. Danh sách các học viên được đào tạo

TT	Năm	Họ tên	Tên luận án	Bậc đào tạo
Đào tạo Tiến sĩ				
1	2001	Đặng Trọng Lương	Hoàn thiện quy trình chuyển gen kháng sâu vào cây bắp cải nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tiến sĩ
2	2003	Nguyễn Hữu Hồ	Nghiên cứu sử dụng mô tế bào có khả năng sinh phôi để tạo cây lúa chuyển gen kháng sâu bằng phương pháp bắn gen và phương pháp dùng vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tiến sĩ
3	2004	Nguyễn Thị Tâm	Nghiên cứu khả năng chịu nóng và chọn dòng chịu nóng ở lúa bằng công nghệ tế bào thực vật	Tiến sĩ
4	2006	Điều Thị Mai Hoa	Nghiên cứu một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử liên quan đến tính trạng chín tập trung của đậu xanh	Tiến sĩ
5	2006	Trịnh Minh Hợp	Xây dựng hệ thống tái sinh và chuyển gen vào cây bông thông qua <i>A.tumefaciens</i>	Tiến sĩ
Đào tạo Thạc sĩ				
1	2002	Lâm Đại Nhân	Phân lập và thiết kế gen mã hóa protein vỏ virus gây bệnh đốm vòng ở đu đủ Việt Nam	Thạc sĩ
2	2003	Nguyễn Thị Thu Hằng	Phân tích cây lúa C71 chuyển gen <i>Xa21</i> và gen <i>TPS</i>	Thạc sĩ
3	2004	Phạm Bích Ngọc	Nghiên cứu phương pháp chuyển gen vào cây khoai lang thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i> và bước đầu phân lập gen có tính kháng bọ hà	Thạc sĩ
4	2004	Nguyễn Hải Yến	Nghiên cứu hoàn thiện hệ thống chuyển gen ở lúa	Thạc sĩ
5	2004	Đoàn Thu Thủy	Phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen	Thạc sĩ
6	2005	Phạm Quang Chung	Nghiên cứu phân lập và thiết kế vectơ gắn hai gen kháng đạo ôn <i>Pi-1</i> và <i>Pi-2(t)</i> ở giống lúa Tép của VN	Thạc sĩ
7	2004	Đinh Thị Xuyên	Nghiên cứu tính đa hình ADN của các dòng vải thiều Thanh Hà bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Thạc sĩ
Đào tạo Cử nhân				
1	2001	Trần Mỹ Linh	Thiết kế Ti-plasmid mang gen ACC Oxydaza phục vụ cho chuyển gen vào cây đu đủ	Cử nhân
2	2002	Nguyễn Trung Nam	Sàng lọc chủng Bt và tinh sạch protein Vip kháng bọ hà khoai lang	Cử nhân
3	2002	Trương Thu Thủy	Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây bông phục vụ chuyển gen	Cử nhân
4	2003	Nguyễn Hoàng Nam	Phân tích cây bông kháng sâu bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Cử nhân

5	2003	Phạm Thị Trà	Xây dựng thư viện DNA genom của chủng <i>Bt</i> có hoạt tính kháng bọt hà ở khoai lang	Cử nhân
6	2003	Giang Thu Thủy	Nghiên cứu kỹ thuật chuyển gen anti-ACO vào cây hoa cúc nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cử nhân
7	2004	Lê Thị Hồng Ngọc	Phân lập gen <i>vip3</i> từ chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> AB51 để tiến tới thiết kế vector chuyển gen vào cây trồng	Cử nhân
8	2005	Nguyễn Thu Trang	Tách dòng và đọc trình tự đoạn ADN liên kết với gen kháng đạo ôn Pi-1 ở giống lúa Monobenkan của Việt Nam	Cử nhân
9	2005	Hân Thị Dung	Tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang gen mã hóa cho protein vỏ vi rút đốm vòng để chuyển vào cây đu đủ	Cử nhân
10	2005	Hoàng Xuân Sinh	Thiết kế vector T-plasmid mang gen GlyP mã hóa kháng nguyên glycoprotein của vỏ virus đại thực vụ chuyển gen thực vật	Cử nhân

Bảng 60. Danh sách các cán bộ được nâng cao trình độ

STT	Thời gian đào tạo	Họ tên	Nội dung đào tạo	Cơ quan
1	10/2002-6/2003	Thái Thị Lệ Hằng	Kỹ thuật sinh học phân tử phân tích cây chuyển gen	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
2	5/2004-11/2005	Nguyễn Thị Dung	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
3	12/2001-6/2002	Phạm Minh Loan	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện KHKTNN VN
4	12/2001-6/2002	Đoàn Thu Thủy	Các phương pháp phân tích cây chuyển gen	Viện KHKTNN VN
5	12/2001-6/2002	Nguyễn Văn Huế	Kỹ thuật chuyển gen ở cây bông bằng vi tiêm vào bầu noãn	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
6	6/2003-3/2004	Nguyễn Thị Nhã	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
7	6/2002-12/2006	Trịnh Minh Hợp	Các kỹ thuật tái sinh và chuyển gen ở cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ

4.6. SẢN PHẨM KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

1. Sưu tập gen *cryIA/b,c*, *ACO*, *GNA*, *Xa21*, *OAT*, *P5CS*, *TPS*, *nhaA* dùng để chuyển vào cây trồng: 9 gen.
2. Phân lập được Gen Pi-1, Pi-t2, *vip*: 3 gen.
3. Quy trình chuyển gen ở lúa bằng *Agrobacterium*: 2 quy trình.
4. Quy trình chuyển gen ở lúa bằng súng bắn gen: 1 quy trình.
5. Quy trình thử sâu đục thân hai chấm hại lúa: 1 quy trình
6. Quy trình đánh giá và nhận biết cây lúa chuyển gen: 1 quy trình
7. Dòng lúa chuyển gen *cryIAc* kháng sâu đục thân: 42 dòng.
8. Quy trình tái sinh cây Bông theo đa chồi (cho 9 giống) và mô sẹo (cho giống SSR60F và Cooker): 2 quy trình.
9. Quy trình chuyển gen vào bông bằng tiêm qua bầu nhụy: 1 quy trình.
10. Cây bông chuyển gen kháng sâu bằng phương pháp vi tiêm: 6 cây
11. Quy trình chuyển gen ở cây hồng: 1 quy trình
12. Dòng cây Hồng chuyển gen *cryIA(c)*: 4 dòng

13. Quy trình nuôi cấy mô và chuyển gen vào hoa cúc: 1 quy trình.
14. Dòng cây hoa cúc chuyển gen *anti*-ACO: 14 dòng.
15. Dòng cây hoa cúc chuyển gen kháng sâu: 20 dòng
16. Phương pháp phân tích cây chuyển gen phòng thí nghiệm: 4/4 phương pháp: PCR, lai Southern, Northern, Western
17. Phương pháp chẩn đoán cây chuyển gen: thử kháng sinh, thử sâu và thử tính chịu mặn, hạn
18. Đào tạo cử nhân: 40 cử nhân.
19. Đào tạo cao học: 7 học viên.
20. Đào tạo Tiến sỹ: 5 nghiên cứu sinh.
21. Đào tạo tại nước ngoài: 4 cán bộ.
22. Đào tạo nâng cao trình độ trong nước: 7 cán bộ.
23. Báo cáo khoa học: 7 báo cáo.
24. Công trình công bố: 13 bài báo
25. Những đóng góp khác của đề tài: tham gia viết tài liệu gồm (i) Mẫu Thỏa thuận chuyển giao nguyên vật liệu gen; (ii) Sách mỏng và (iii) 12 tờ tài liệu để phổ biến về an toàn sinh học và lợi ích của cây trồng chuyển gen

4.7. HỢP TÁC QUỐC TẾ

Bảng 61. Hợp tác quốc tế

Tên đối tác	Nội dung hợp tác
UC Davis	1. Cung cấp gen <i>Xa21</i>
ISAAA	2. Môi giới tiếp nhận bản quyền
EU (Bỉ, Tây Ban Nha, Pháp)	3. Phối hợp chuyển gen <i>P5CS</i> , <i>OAT</i> , <i>TPS</i> , <i>nhaA</i> , <i>HAL</i> , <i>nhaA</i> , <i>HAL</i> vào lúa
ASEA (Thailand, Malaysia, Philippine, Indonesia)	4. Thiết kế gen ACO - antisense
Syngenta (Novartis)	5. Chứng <i>Bt</i> để sàng lọc gen <i>Bt</i> mới
CIRAD (Pháp)	6. Đào tạo cán bộ đi học kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông

4.8. TÌNH HÌNH SỬ DỤNG KINH PHÍ

Tổng kinh phí SNKH: 3.000.000.000 đồng (Ba tỷ đồng chẵn)

Tổng kinh phí đã quyết toán: 2.926.477.750

Kinh phí phân bổ cho các hạng mục:

STT	Mục	Hạng mục chi	Số tiền(đồng)	Ghi chú
1	114+101	Thuê khoán chuyên môn	1.049.000.000	
2	119+109	Nguyên vật liệu + Năng lượng	1.313.000.000	
3	117	Sửa chữa nhỏ	118.200.000	
4	145	Thiết bị máy móc	235.000.000	
5	134	Chi phí khác	211.277.750	
		Tổng	2.926.477.750	Còn lại 73.522.250 của mục 115 Đoàn ra chưa chi hết

4.9. DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1. **Trần thị Cúc Hoà, Lê Trần Bình, Bùi Bá Bổng (2003).** *Tiêu chuẩn hoá hệ thống chọn lọc mannose và ứng dụng hệ thống chuyển nạp trong chuyển nạp gen hữu dụng bằng Agrobacterium ở lúa.* Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
2. **Trần thị Cúc Hoà, Lê Trần Bình, Bùi Bá Bổng (2004).** *Chuyển gen kháng côn trùng cry1 Ab và cry1 Ac vào một số giống lúa bằng Agrobacterium và sử dụng hệ thống chọn lọc manose.* Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. 6: 821-823.
3. **Phạm Quang Chung, Lê Trần Bình, Nguyễn Đức Thành (2003).** *Tách dòng và đọc trình tự gen kháng đạo ôn Pi-1(t) từ giống lúa C101A51.* Tạp chí Công nghệ Sinh học. 1: tr. 65 - 70.
4. **Lê Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2003).** *Cây trồng biến đổi di truyền: Thực trạng và triển vọng,* Tạp chí Công nghệ Sinh học. 1: tr. 265 - 285.
5. **Phạm Thị Trà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Mùi (2003).** *Xây dựng thư viện gen từ chủng Bacillus*

- thuringiensis* AB51 có hoạt tính kháng bọt hà. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
6. Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyến (2003). *Nghiên cứu quy trình tái sinh cây bông (Gossypium hirsutum) từ phôi*. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 7. Trương Thu Thủy, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Lê Quang Quyến. (2003). *Xây dựng quy trình tái sinh cây bông (Gossypium hirsutum) bằng cách tạo đa chồi*. Tạp chí Di truyền và ứng dụng. Tập 2. Trang 45-51.
 8. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ (2003). *Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro cây Hồng (Paulownia fortunei) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen*. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 9. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). *Tạo cây Hồng (Paulownia fortunei) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens*. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 10. Nguyễn Thị Hồng Châu, Nguyễn Phương Thảo, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội. (2003). *Chuyển gen thông qua Agrobacterium tumefaciens vào giống lúa C71*. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 1: tr. 219 - 226
 11. Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng Châu, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình (2004). *Phân tích các dòng cây lúa C71 chuyển gen TPS*. Đã gửi đăng ở Tạp chí CNSH
 12. Đoàn Thu Thủy, Hồ Hữu Nhị (2004). *Phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen*. Đã gửi đăng ở Tạp chí CNSH
 13. Nguyễn Thị Lan Hoa, Doãn Thị Hoà, Đặng Trọng Lương, Vũ Đức Quang, Phi Công Nguyên, Đặng Thị Minh Trang, Đỗ Minh Huy (2003). *Những kết quả bước đầu chuyển gen anti-ACO vào cây hoa cúc*. Tạp chí CNSH ứng dụng, số 2+3/2003, tr 20-25.

4.10. HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI

Ngoài những kết quả vượt mức đăng ký so với thuyết minh và hợp đồng nghiên cứu, đề tài còn có một số nội dung chưa hoàn thành sau:

- Với nội dung tạo cây lúa chuyển gen kháng bệnh bạc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* đã thu được 13/41 dòng cây có tính kháng bệnh bạc lá theo phân cấp tiêu chuẩn của IRRI. Tuy nhiên, kết quả phân tích PCR cho thấy đã không nhận được dòng cây nào còn mang gen *Xa21*, có thể do kích thước gen quá lớn.
- Tạo cây lúa chuyển gen kháng bệnh đạo ôn thông qua *Agrobacterium* hay súng bắn gen. Hiện đề tài đã hoàn thành việc phân lập gen, thiết kế vector chuyển gen mang gen *Pi* kháng bệnh đạo ôn. Sắp tới đề tài sẽ tiến hành chuyển gen kháng bệnh đạo ôn vào cây lúa C71.
- Do chưa có một văn bản pháp lý về Quản lý An toàn sinh học các sinh vật biến đổi gen thông qua nên ở thời điểm này đề tài chưa mở rộng việc thực hiện được các thử nghiệm ngoài đồng ruộng cho các cây trồng chuyển gen.
- Về tình hình sử dụng kinh phí của đề tài còn lại 73.522.250 đồng của mục 115 - Đoàn ra chưa chi hết, đề nghị được phép sử dụng số kinh phí tiết kiệm cho phát triển tiềm lực KH-CN của đơn vị.

CHƯƠNG 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. KẾT LUẬN

1. Phân lập được gen *vip3* từ chủng *Bacillus thuringiensis* AB51, gen *Pi-2t* từ giống lúa C101A51 và *Pi-1t* từ giống lúa tẻ tếp và thiết kế thành công được vector chuyển gen pBI121 mang cấu trúc 35s/*vip3*/NOST.

2. Xây dựng hệ thống tái sinh 7 giống bông Việt Nam và 2 giống SSR60F và giống Cocker phục vụ chuyển gen, trong đó đã tái sinh được giống bông SSR60F và giống Cocker thông qua mô sẹo và đã hoàn thiện qui trình tái sinh thông qua tạo đa chồi cho 9 giống bông phục vụ chuyển gen.

3. Hoàn thiện quy trình nuôi cấy mô cây Hồng, cây Hoa cúc, cây lúa và đã sử dụng chúng để chuyển gen.

4. Xây dựng được 3 qui trình chuyển gen hữu hiệu: thông qua *Agrobacterium* đối với cây lúa, cây Hồng và cây Hoa cúc, sử dụng máy bắn gen đối với cây lúa và qui trình chuyển gen bằng vi tiêm trực tiếp vào noãn hoa qua ống phấn đối với cây bông vải.

5. Đặc biệt xây dựng phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* và hệ thống chọn lọc bằng mannose (thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hay chất kháng thuốc trừ cỏ).

6. Thu được tổng cộng trên 210.000 hạt bông sau tiêm chuyển gen kháng sâu và 4000 hạt sau tiêm chuyển gen chịu hạn. Bước đầu sàng lọc được 11.000 hạt T1 của 3 giống D16-2, VN36-P, MUC9 chuyển gen kháng sâu.

7. Kết quả cho đến nay đề tài tạo được 86 dòng cây chuyển gen làm vật liệu cho nghiên cứu tạo giống hoặc được sử dụng để nghiên cứu tạo giống trực tiếp bao gồm:

- 37 dòng lúa chuyển gen T2 giống IR64 và 5 dòng lúa T4 giống C71.
- 5 dòng cây Hồng chuyển gen T0 mang gen *cryIA(c)*.
- 14 cây hoa cúc T0 mang gen anti-ACO và 20 cây hoa cúc T0 mang gen *cryIA(c)*.
- 6 dòng bông T2 chuyển gen *cryIA(c)* giống 254

Bằng các kỹ thuật sinh học và sinh học phân tử chúng tôi đã xác định được các gen này hiện diện trong các dòng cây chuyển gen và các gen chuyển đã hoạt động và biểu hiện tính trạng rất rõ rệt.

8. Xây dựng được qui trình nhận biết và đánh giá cây chuyển gen qui mô từ phòng thí nghiệm đến nhà lưới cho các đối tượng cây trồng như cây lúa, bông, hồng và hoa cúc:

9. Đề tài đã công bố được 13 bài báo, đang in 1 sách, đã in 12 tài liệu phổ biến, đào tạo được 5 Nghiên cứu sinh, 7 Thạc sĩ và 10 Cử nhân.

5.2. ĐỀ NGHỊ

Để có thể tiếp tục phát triển tiếp các kết quả nghiên cứu, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị như sau:

1. Tiến hành chuyển gen kháng sâu *vip3* vào cây bông vải và một số đối tượng cây trồng khác như: đậu tương, ngô thông qua *Agrobacterium*. Tiếp tục chuyển gen kháng bệnh bạc lá, bệnh đạo ôn vào cây lúa.
2. Sớm được thử nghiệm trên đồng ruộng các dòng lúa chuyển gen kháng sâu và bước đầu đánh giá mức độ an toàn của cây chuyển gen với sinh thái và môi trường.
3. Việc tạo các cây trồng chuyển gen là một bước tiến bộ khoa học và kỹ thuật rất lớn với khả năng ứng dụng rộng rãi phục vụ cho sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học Việt Nam nay có đủ khả năng để tham gia vào lĩnh vực nghiên cứu này, đề nghị Bộ Khoa học và Công nghệ cần tiếp tục hỗ trợ tiếp kinh phí cho đề tài để mở rộng các kết quả trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Đặng Trọng Lương, Nguyễn Đức Doanh, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng, Trần Duy Quý (1999). Nghiên cứu chuyển gen *cryIAc* kháng sâu vào một số giống cải bắp (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) qua *Agrobacterium*. Báo cáo khoa học. Viện Di truyền Nông nghiệp
2. Đinh Thị Phòng (2001). Nghiên cứu khả năng chịu hạn và chọn dòng chịu hạn ở lúa bằng Công nghệ tế bào thực vật. *Luận án Tiến sĩ Sinh học*.
3. Đoàn Thị Ái Thuyền, Vũ Ngọc Phượng, Thái Xuân Du, Nguyễn Văn Uyển (2001). Nhân giống vô tính cây Hồng (*Paulownia fortunei*) bằng nuôi cấy mô. *Sách Công Nghệ Sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững*. tr. 63-68.
4. Dự án UNEP-GEF (2003). Điều tra các cơ chế hiện có nhằm thống nhất quá trình đánh giá và quản lý rủi ro, sự công nhận giữa các bên về số liệu và xử lý số liệu. Viện Công nghệ Sinh học.
5. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998) *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*, Nxb Đại học Quốc Gia, Hà Nội.
6. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). Tạo cây hồng (*Paulownia fortunei*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 16-17/12/2003. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật (Hà Nội), tr. 1088-1090.
7. Nguyễn Đức Doanh (1998). Tổng quan về cây chuyển gen từ năm 1986-1997. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
8. Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Trần Thị Dung, Nguyễn Văn Uyển (2001). Tạo cây thuốc lá chuyển gen kháng sâu, kháng thuốc trừ cỏ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và khảo sát sự di truyền các tính trạng nói trên ở thế hệ T₁. *Công nghệ sinh học và nông nghiệp sinh thái bền vững*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 16-21.
9. Nguyễn Trung Nam, Vũ Đình Hoà, Đinh Sơn Quang, Nguyễn Thị Bích Thuỷ, Võ Thị Thứ, Lê Trần Bình (2000). Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ cho việc phân lập gen kháng bọ hà ở khoai lang, *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học năm 2000-2001*, Tr. 206-216.
10. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 16-17/12/2003. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật (Hà Nội), tr. 1088-1090.
11. Phan Tố Phượng, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý, Phạm Thu Hằng, C.M. Clauder, S. Zang, L. Chen, R.N. Beachy (2001). Chuyển gen kháng Hygromycin, gen GUS và gen kháng bệnh bạc lá Xa21 vào lúa bằng súng bắn gen. Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000. Viện Di truyền Nông nghiệp.

12. Trần Bích Lan, Nguyễn Đức Doanh (1998). Kết quả bước đầu sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* trong nghiên cứu chuyển gen vào lúa ở Việt Nam. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
13. Võ Thị Thứ (1996). Nghiên cứu DNA plasmit, gen mã hóa sự tổng hợp tinh thể protein của các chủng *Bacillus thuringiensis*, *Tạp chí sinh học*, số 3, tr. 23-25.
14. Lê Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). Cây trồng biến đổi di truyền: Thực trạng và triển vọng, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 1: tr. 265 – 285
15. Phạm Thị Trà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Mùi (2003). Xây dựng thư viện gen từ chủng *Bacillus thuringiensis* Ab51 có hoạt tính kháng bọt hà. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
16. Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyến (2003). Nghiên cứu quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) từ phôi. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
17. Trương Thu Thủy, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Lê Quang Quyến (2003). Xây dựng quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) bằng cách tạo đa chồi. *Tạp chí Di truyền và ứng dụng*. Tập 2. Trang 45-51.
18. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
19. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). Tạo cây Hồng (*Paulownia fortunei*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
20. Nguyễn Thị Hồng Châu, Nguyễn Phương Thảo, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (2003). Chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* vào giống lúa C71. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 1: tr. 219 - 226

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

21. A Selvapandian, N. Arora, R. Rajagopal, S. K. Jalali, T. Venkatesan, S. P. Singh, and Raj K. Bhatnagar (2001). "Toxicity Analysis of N- and C- Terminus- Deleted Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis*", *Applied and Environment Microbiology*, Vol. 67, No. 12, pp. 5855-5858.
22. Aldermita RR, Hodges TK. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica indica* rice varieties. *Planta*. 199: 612-617.
23. An, G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988). Binary Vectors In: Gelvin SB, Schilperoot RA, Verma DPS (eds) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 1-19.
24. Anatole F. K. (1997). Insects Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries, *ISAAA Briefs* (1997).
25. Ausubel F. et al (1989). *Current protocols in molecular biology*. NewYork: Greene Publishing

Associates.

26. *Bacillus thuringiensis*, <http://www.helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm#crest>, The Microbial World.
27. Bonman, J. M., Estrade, B. A., Kim, C. K., and Lee, E. J., (1991). "Assessment of blast disease and yield loss in susceptible and partial resistance ricecultivars in two irrigated lowland environments". Plant disease, PP.75.
28. C. G. Yu, M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel, J. J. Estruch (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects", *Appl. Environ. Microb*, No. 63, pp. 532-536.
29. Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. S. Wu, J. H. Xiao, Z. H. Yu, P. C. Ronal, S. E. Harrington, G. Second, S. McCouch and S. D. Tanksley (1994). Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetic.*, 138: 1251-1274.
30. Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nestor EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3672-3676.
31. Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources, *Sci Sinica* 18: 659-668.
32. Crickmore T. R., D. R. Zeiler (1998). "Revision of the nomenclature for the *B.t* pesticidal crystal protein", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No ?, pp. 807-813.
33. Datta K, Vasquez Z, Tu J, Tonlzo I, Alam MF, Oliva N, Abugo E, Khush GS, Datta SK. (1998). Constitutive and tissue specific differential expression of the *cryI (A)b* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pests. *Theor Appl Genet.* 97: 20-30.
34. LeRudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, and Valentine RC (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science.* 224, 1064-1068.
35. Delannay X, LaVallee BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Marrone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG, Fischhoff DA (1989). Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var 'kurstaki' insect control protein. *Bio/Technology* 7:1265-1269
36. Duan X, Li X, Xue Q, Abo E.I, Sand M, Xu D, Wu R. (1996). Transgene rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnol* 14: 494-498.
37. E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D.H. Dean (1998). "Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal protein", *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol. 62, No. 3, pp. 775-806.
38. Edmonds H.S., Gatehose L.N., Hilder V.A., Gatehose J.A. (1996). the inhibitory effects of the cysteine protease inhibitors, oryzacystain, on digestive protease and on larval survival and development of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howard*), *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 78, pp. 83-94.

39. Estruch J. J., Warren G. W., Mullins M. A., Nye G. J., Craig J. A., Koziel M. G. (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, No.93, pp. 5389-5394.
40. Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*.12: 883-888.
41. Fukuoka, S. and K. Okuno. (2001). *QTL analysis and mapping of pi21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice*. *Theoretical Applied Genetic*, 103: 185-190.
42. Geert Angenon, Willy Dillen, and Marc Van Montagu. Laboratorium voor Genetica. Univeristiteit Gent. B-9000 Gent. Belgium. Antibiotic resistance marker for plant transformation.
43. Greogry W. Warren, Michael G. Koziel, Martha A. Mullins, Gordon J. Nye (1995). Method for isolating vegetative insecticidal protein genes, United States Patent, Patent number 5866326.
44. Grochulski P., L. Masson, S. Borisova, M. Puzstal- Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(c) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation", *J. Mol. Biol.*, No. 254, pp. 447-464.
45. Gunasekaran M., Weber D.J., "Molecular biology of the biological control of pet and diseases of plants", CRC Press, Boca Raton, Frolida, pp. 105-122.
46. Hari C. Sharma, Kiran K. Sharma, Nadoor Seetharama, Rodomiro Ortiz (2000). "Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement", *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, [http:// www.ejbiotechnology. info/content/ vol3/ issue2/full/3/bip/](http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue2/full/3/bip/).
47. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282.
48. Hittalmani, S., Reini, S., Mew, T., Rodriguez, R. L., and Huang, N. (1994). *Identification of blast resistance gene Pi-2(t) via specific primer amplified genomic DNA*. *Theoretical Applied Genetic*, 91: 9-14.
49. Hoa TTC and Bong BB (2003). *Efficient Agrobacterium-mediated transformation of indica (Oryza sativa L.) using manose selection system*. *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*: 1+2 : 60-63.
50. Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I Beyer P. (2003). *Golden Indica Japonica Rice Lines Amennable to Dereglulation*. *Plant Physiol*. 133: 161-169
51. Hoekema A, Roelvin PW, Hooykaas P J J, Schilperoort RA. (1984). *Delivery of T-DNA from the Agrobacterium tumefaciens chromosome into plant cells*. *EMBO J*, 3: 2485-2490.
52. Hofte H., Whiteley H. R. (1989). "Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*", *Microbial Rev.*, No.53, pp. 242-255.
53. INCO annual report 1998-2000.

54. Ion exchange chromatography - Principles and Methods. Amersham Pharmacia biotech, pp 11-13.
55. J. Li, J. Carroll, D. J. Ellar (1991). "Crystal structure of insecticidal - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution", *Nature*, 353, pp. 815-821.
56. Jame Clive. (2003). *Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops*. ISAAA Briefs No. 30. ISAAA, pp 3-4.
57. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
58. Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Peterson SG, Brunstedt J and Okkels FT. (1998). *Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet*. *Mol Breed* 4: 111-117
59. John Bennett. Genes for crop Improvement. Division of Plant Breeding, Genetics and Biochemistry. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
60. Kumar PP, Rao DC, Goh C-J (1988). Influence of petiole and lamina on adventitious shoot initiation from leaf of *Paulownia fortunei*. *Plant Cell Rep*. 17: 886-890
61. Li J., P. A. Konl, D. J. Ellar (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and implications for membrane pore formation", *J.Mol. Biol.*, No.257, pp. 129-152.
62. Li L, Qu R, Kochko de A, Fauquet C, Beachy RN (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12:250-255
63. Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology* 13:686-691
64. M. M. Lecade et al (1996). Colletion of *B.t.*, No.1, IEBC Catalog, Paris.
65. McCouch SR, Kochehert G, Yu ZH, Wanh ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD, (1988). *Molecular mapping of rice chromosomes*. *Theor Appl Genet* 78: 815-829.
66. Miles JS and Guest JR. (1984). *Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene of Escherichia coli*. *Gene* 32: 41-48.
67. Murashige T, Skoog F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiol Plant* 18: 473-497.
68. Nagato, Y. and A. Yoshimura (1998). *Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups*. *Rice Genetic National*, 15: 13-74.
69. Nancy L. Mathis and Maud A.W. Hinchee (1994). *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissue. *Crop Transformation*. Monsanto Co. St. Louis. MO63198. USA.
70. Nayak P, Basu D, Das S, Basy A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK. (1997). Transgenic elite *indica* rice plants expressing CryIAc delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant again yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2111-2116
71. Niels J. Galjart, Natarajan Sivasubramainian, and Brian A. Federici (1987). "Plasmit

- Location, Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding a 27.3- Kilodalton Cytolytic Protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14)", *Current Microbiology*, No.16, pp. 171-177.
72. Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939-943
 73. Pual J.J. Hookykaas, Teresa Mozo (1994). *Agrobacterium* molecular genetics. Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, p1-9B3.
 74. Ray Wu and Ajay Garg (2002) Engineering rice plants with trehalose-Producing genes improves tolerance to drought, salt, and low temperature. *Planta* 201: 293-297.
 75. Roossens NH, Thu TT, Iskandar HM, Jacobs M (1998) Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 117: 263-271.
 76. Saghai Maroof M. A., Biyashev R. M., Yang G. P., Zhang Q., R. W. Allard (1984). *Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics*. *Process National Academic Science. USA* 91: 5466-5470.
 77. Sambrook, J. and Russell, D. W., (2001). *Molecular Cloning*, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 78. Seungil Han, Joyce A.Craig, Christopher D. Putnam, Nadine B. Carozzi, Jonh A. Tainer (1999). "Evolution and mechanism from structure of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex", *Nature structural biology*, Vol. 6, No. 10, pp. 932-936.
 79. Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM (1996). Selection of large quantities of embryogenic calli from *indica* rice seeds for production of fertile transgenic plants using biolistic method. *Plant Cell Rep* 15:322-327
 80. Stanton B. Gelvin , Chang - Nong Liu (1994). Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. *Plant molecular biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, 1994, p1-9B3.
 81. Susheng Gan (1995), Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. PhD thesis at Univ. Wisconsin-Madison.
 82. Sylvain Espinasse, Michel Gohar, Josette Chaufaux, Christophe Buisson, Stephane Perchat, Vincent Sanchis (2002). "Correspondence of High Levels of Beta- Exotoxin I and the Presence of *cryIB* in *Bacillus Thuringiensis*", *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 4182-4186.
 83. Tabien, R. E., Z. Li, A. H. Paterson, M. A. Marchetti, J. W. Stansel and S. R. M. Pinson (2000). *Mapping of four major rice blast resistance genes from "Lemont" and "Teging" and evaluation of their combinatorial effect for field resistance*. *Theoretical Applied Genetic*, 101:1215-1225.
 84. The Life Sciences Network (2003). Vip cotton ready to launch in 2004, 2005, <http://www.lifesciencesnetwork.com/newsdetail.asp?newsID=3072>.(Syngenta)
 85. Tsai, W. H. (1998). *Estimation of rice yielosses caused by leaf blast disease*, J. Taiwan

AgricRes., PP. 37.

86. V. A. Doss, K. Anup Kumar, R. Jayakumar, V. Sekar (2002). "Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (Vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, (26), pp. 82-88.
87. Vaecck M, Reynaerts A, Huwfter H, Jansens S, DeBeuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Montagu MV, Leemans J (1987). *Transgenic plants protected from insect attack*. Nature 328:33-37
88. Van Wordragen MF, Dons HIM (1992). *A.tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. Plant Molecular Biology manual. Rep. 10: 12-36.
89. Vance Kramer (2002). *Protocol of DNA isolation of Cosmid library*, Syngenta company, USA.
90. Wang, G-L., D. J. Mackill, J. M. Bonman, S. R. McCouch, M.C. Champoux and R. J. Nelson. (1994). *RFLP mapping of conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar*. Genetics, 136: 1421-1434.
91. Wiinn J, Klotti A, Burhardt PK, Ghosh Biswas GC, Launis K, Iglesias VA, potrykus I. (1996). *Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic cry1A(b) gene from Bacillus thuringiensis provides effective pest control*. Bio/Technology 14: 171-176.
92. Wright W, Dawson J, Dunder E, Suittie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L. (2001). *Efficient biolistic transformation of maize (Zea mays L.) and wheat (Triticum aestivum L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker*. Plant Cell Rep. 20: 429-436.
93. Wu G, Cul H, Ye G, Xin Y, Sardam.R, Cheng X, Li Y, Altosaar, Shu Q. (2002). *Inheritance and expression of the cry1Ab gene in Bt (Bacillus thuringiensis) transgenic rice*. Theor Appl Genet. 104: 727-734.
94. Ye X, Al-Babill S, Kletle A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. (2000). *Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm*. Science 287: 303-305
95. Zhang S. et al. (1998), *Transgenic elite indica rice varieties, resistant to Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. Molecular Breeding 4, 551- 558
96. Zheng, K. L., Chai, R.Y., Jin, Z. M., Wu, J. L., Fan, Y. Y., Leung, H., Zhang, J. Y (1998). *"Mapping of leaf and blast resistance genes with RFLP, RAPD and resistance gene analog in rice"* 2nd International rice blast conference, Franch, PP.13.

PHẦN PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Phương pháp phân tích và đánh giá cây chuyển gen

Phụ lục 2. Các trình tự Nucleotit của các gen phân lập

Phụ lục 3. Các công trình công bố liên quan đến đề tài

Phụ lục 4. Hợp đồng chuyển giao nguyên vật liệu

Phụ lục 5. Biên bản nghiệm thu cơ sở của các đề tài nhánh

PHỤ LỤC 1.

Phương pháp phân tích và đánh giá cây chuyển gen

Phụ lục 1.

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ CÂY CHUYỂN GEN

1. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CÂY CHUYỂN GEN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

1.1. Phương pháp thực hiện kỹ thuật Southern Blot

Sử dụng bộ Kit AlkPhos Direct Labelling and Detection Systems của công ty Amersham Pharmacia Biotech.

1.1.1. Tách chiết ADN của nhiễm sắc thể cây chuyển gen

Nhiễm sắc thể từ lá cây Hồng trồng ngoài vườn ươm được tách chiết bằng phương pháp CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Khoảng 5 gam lá được làm đông cứng bằng nitơ lỏng và nghiền trong dung dịch đệm CTAB (nóng 65°C) gồm 2% CTAB, 0.1M Tris-HCl, 0,02M Na₂-EDTA, 1.4M NaCl, 1%PVP. Hỗn hợp được ủ ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp với 10 ml chloroform/isoamyl alcohol được trộn đều, xon ly tâm ở 3000vòng trong 10 phút. Phần dịch trong trên được lấy cho vào ống nhựa mới. Thêm 1 phần thể tích iso-propanol. Giữ lạnh 4°C trong 1 giờ đem ly tâm ở 3000 vòng trong 20 phút. Loại bỏ dịch trên, rửa kết tủa trắng bằng cồn 70% tiếp ly tâm ở 3000 vòng trong 5 phút, loại bỏ cồn để khô kết tủa trong nhiệt độ phòng và hoà tan bằng dung dịch đệm TE, có thể xử lý mRNA bằng enzym RNase, ủ trong 37 °C trong vài giờ để ADN của nhiễm sắc thể cây tan hoàn toàn. Sau đó đo lượng ADN.

1.1.2. Sử dụng enzyme giới hạn để cắt ADN của nhiễm sắc thể cây chuyển gen

Sử dụng enzym giới hạn Hind III để cắt ADN, thiết lập phản ứng cắt như sau:

- Nhiễm sắc thể (ADN) cây: (100g) 40 µl
- Buffer (10x): 4 µl
- Hind III: 2 µl
- H₂O: 14 µl
- Tổng cộng: 60 µl

Giữ hỗn hợp phản ứng ở 37°C qua đêm.

1.1.3. Chạy điện di ADN của nhiễm sắc thể cây chuyển gen sau khi cắt bởi enzym

Enzym sử dụng được thể hiện ở Hình 2.1.

Cân 3,5 g Agarose hòa tan trong 350ml dung dịch đệm 1x TAE bằng lò vi ba.

- Để nguội dung dịch khoảng 55°C cho vào 14 µl EB, đổ vào khung bộ điện di.
- Cho ADN đã cắt cùng với thuốc nhuộm vào các giếng của gel. Theo thứ tự : thang

chuẩn (Lamda DNA cắt bởi Hind III), PC: gen *cryIA(c)*, NC: ADN cây không chuyển gen, ADN cây chuyển gen.

- Chạy điện di ở 20 V cho đến khi mẫu đã đi được 3/4 gel.

Pha hoá chất

Dung dịch x50 TAE: 242g Trizma base + 18,6g EDTA hòa tan trong 8000 ml nước cất, chỉnh pH = 8 bằng acid acetic. Lên thể tích 1000ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.

1.1.4. Chuyển ADN của nhiễm sắc thể cây từ gel vào màng Hybond-N

- Đặt gel vào khay đựng 300 ml HCl 0,25N (Depurinating solution). Lắc nhẹ khay trong 10 phút, rồi đổ bỏ dung dịch acid và tráng bằng nước cất.
- Làm biến tính ADN với dung dịch 0,4N NaOH (Denaturing solution). Lắc nhẹ khay trong 30 phút. Loại bỏ dung dịch NaOH và tráng bằng nước cất.
- Trung hòa gel bằng cách lắc nhẹ khay với dung dịch trung tính (Neutralizing solution) khoảng 30 phút.
- Rửa gel bằng nước cất vô trùng và chuẩn bị cho gel tiếp xúc với màng Hybond-N.
- Đổ dung dịch 20xSSC vào khay có miếng kiếng thủy tinh đặt trên thành khay. Sử dụng 3 tấm giấy thấm 3MM (đã thấm ướt trước với dung dịch 20xSSC) phủ trên miếng kiếng cho giấy nhúng vào dung dịch 20x SSC.
- Đặt gel vào trên giấy 3MM, phủ màng Hybond-N trên gel không để có bọt khí. Đặt tiếp 3 miếng giấy 3MM trên màng Hybond-N (đã thấm ướt trước với dung dịch 20xSSC), phủ một chồng giấy thấm lên phía trên, xong đặt một vật nặng để đè trên các tấm giấy. Để quá trình chuyển ADN vào màng Hybond-N qua đêm.
- Gỡ bỏ tất cả giấy một cách nhẹ nhàng, rửa màng Hybond-N bằng dung dịch 20x SSC, rồi đặt vào buồng lai.

Pha hoá chất

- **Dung dịch 20x SSC:** 88,23 g Tri-sodium citrate + 175,32 g NaCl hòa tan trong 800 ml nước cất chỉnh pH = 7-8. Lên thể tích 1000 ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.
- **Dung dịch lọc trong (Depurinating solution):** 11 ml HCl + 989 ml nước cất. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 1 tháng.
- **Dung dịch biến tính (Denaturing solution):** 87,66 g NaCl + 20g NaOH hòa tan trong 1000 ml nước cất. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 1 tháng.
- **Dung dịch trung tính (Neutralizing solution):** 87,66 g NaCl + 60,5 g Trizma hòa tan trong 800 ml nước cất chỉnh pH = 7,5 bằng HCl. Lên thể tích 1000 ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.

1.1.5. Chuẩn bị probe đánh dấu

- Pha loãng 20 μ l dung dịch cross linker (có sẵn trong bộ Kit) với 80 μ l nước thành dung dịch có nồng độ sử dụng (dung dịch phản ứng cross linker). (Có thể bảo quản lạnh 2 - 8°C trong 1 tuần).
- Pha loãng DNA(gen *cryIA*) với nước tới nồng độ 10 ng/ μ l dùng để đánh dấu (Nồng độ muối trong mẫu DNA nên được giữ ở mức thấp nhất, không quá 50 mM).
- Cho 10 μ l DNA đã pha loãng vào trong ống nhựa ly tâm và làm biến tính bởi nhiệt độ bằng cách đun 5 phút trong nước đang sôi mạnh. (Phản ứng đánh dấu có thể gia tăng với tỉ lệ các thành phần gia tăng đồng đều).
- Làm lạnh ngay trên đá trong 5 phút. Ly tâm nhanh để dồn dung dịch xuống đáy ống.
- Thêm 10 μ l dung dịch đệm phản ứng Reaction buffer (có sẵn trong bộ Kit) vào DNA đã được làm lạnh. Đảo trộn nhẹ cho đều (Phản ứng nên giữ trên đá).
- Thêm 2 μ l chất đánh dấu Labelling reagent (có sẵn trong bộ Kit). Trộn nhẹ, đều.
- Thêm 10 μ l dung dịch phản ứng cross linker. Trộn đều. Ly tâm nhanh để dồn hỗn hợp xuống đáy ống.
- Ủ 30 phút ở 37°C cho phản ứng xảy ra.
- Probe có thể được dùng ngay hoặc giữ trên đá đến 2 giờ. Trong trường hợp muốn bảo quản lâu hơn Probe đã đánh dấu được giữ trong 50% glycerol ở -15°C đến -30°C cho đến 6 tháng (Không cần xử lý gì thêm dung dịch probe này sau khi bảo quản).

1.1.6. Lai

- Đun trước (khoảng 50 ml) dung dịch đệm lai AlkPho Direct đến 55°C. Dung dịch đệm AlkPhos Direct cần dùng phải được chuẩn bị trước khi đem lai bằng cách thêm NaCl để đạt nồng độ 0.5M(1,45 gNaCl) và chất kết gắn (Blocking reagent) 2 g để đạt nồng độ 4% (w/v) . Có thể thay thế tích dung dịch đệm tùy thuộc vào thể tích vật chứa và số lượng của màng đem lai.
- Đặt màng vào trong dung dịch lai và giữ ít nhất 15 phút ở 55°C trong buồng lai.
- Cho dung dịch probe đã được đánh dấu vào dung dịch lai trong buồng lai. Nên lấy một phần dung dịch buffer đang dùng ra và trộn đều với probe rồi đổ vào lại phần dịch trong dung dịch lai.
- Lai ở 55°C qua đêm trong buồng lai .
- Pha hoá chất: 50 ml dung dịch đệm lai AlkPho Direct phải được chuẩn bị trước khi đem lai bằng cách thêm 1,45g NaCl để đạt nồng độ 0.5M và 2g chất kết gắn (Blocking reagent) để đạt nồng độ 4% (w/v) . Hòa tan bằng khuấy đều trong 1 giờ sử dụng ngay hay trữ ở -20°C.

1.1.7. Rửa màng sau khi lai

- Đun dung dịch rửa 1 đến 55°C. Lượng dung dịch rửa 1 ước lượng 2-5 ml/cm² màng hoặc nhiều hơn.
- Chuyển cẩn thận màng vào dung dịch này và lắc nhẹ trong 10 phút ở 55°C.
- Rửa lại lần thứ hai trong dung dịch rửa 1 mới trong 10 phút ở 55°C.
- Đặt màng trong hộp sạch và cho vào một lượng buffer rửa 2. Lắc nhẹ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa lại lần thứ hai trong dung dịch rửa 2 mới trong 5 phút ở nhiệt độ phòng (Có thể lấy màng ra khỏi dung dịch rửa 2 khoảng 30 phút trước khi thực hiện phản ứng phát hiện).

Pha hoá chất

Dung dịch rửa 1: pha 1000 ml

- Ure: 120 g
- SDS: 1 g
- Na phosphate 0, 5 M pH 7 : 100 ml
- NaCl: 8,7 g
- MgCl₂ 1M: 1 ml
- Blocking reagent: 2 g

Dung dịch rửa 1 giữ được 1 tuần trong 4°C.

Dung dịch rửa 2 (Stock 20x): pha 100 ml

- Tris Base : 12,1 g
- NaCl : 11,2 g
- Chỉnh pH=10 , dung dịch này giữ trong 4°C đến 4 tháng.

Dung dịch rửa 2: Pha loãng 20 lần (20 ml stock + 180 ml nước cất) với 500 μ l dung dịch MgCl₂ 1M. Dung dịch rửa 2 pha xong sử dụng ngay.

1.1.8. Phát sinh tín hiệu quang hoá và phản ứng phát hiện với CDP-Star

- Đổ dung dịch rửa 2 đi (bằng cách giữ một góc của màng vào thành hộp trong khi đổ dịch đi), rồi đặt màng lên một mặt phẳng không thấm. Không để màng bị khô (Dùng Saran Wrap).
- Dùng pipet hút 3ml chất phát hiện cho đều lên màng và để 2-5 phút rồi đổ bỏ phần dịch dư thừa trên bề mặt.

- Bao màng trong Saran Wrap. Đặt màng lên cassette sao cho phía có DNA ở trên tiếp xúc với mặt phim.
- Trong phòng tối, đặt phim lên màng. Đậy cassette lại. Để qua đêm.
- Rửa phim.

1.2. Phương pháp thực hiện kỹ thuật Western blot

1.2.1. Thu thập mẫu và tạo dịch chứa protein

- Cắt nhỏ khoảng 0,5 g lá cây hông chuyển gen cho vào tuýp nhựa.
- Cho vào 1 ml dung dịch tách chiết mẫu (PBS), nghiền mẫu xong ly tâm ở 3000 vòng trong 10 phút nhiệt độ 4° C.
- Lấy dịch phía trên cho vào tuýp mới.
- Tạo hỗn hợp như sau : 40 µl dung dịch chiết protein+ 40 µl dung dịch đệm mẫu 2X SDS (2X SDS sample buffer)+ 4 µl β-mercaptoethanol.
- Đun sôi dung dịch trên ở 100 °C trong 10 phút.

1.2.2. Pha hóa chất

- Dung dịch tách chiết mẫu (PBS): cho 1000 ml (1X): NaCl 8g, KCl 0, 2 g, Na₂HPO₄ 1,44g, KH₂PO₄ 0,24g. Hòa tan trong nước cất và lọc qua phin vô trùng 0.45µm.
- Dung dịch đệm mẫu 2X SDS (2X SDS sample buffer): cho 10 ml: glycerol 2ml, SDS 0,4g, Bromophenol blue: 4 mg, Tris 0,152g, DTT 60mg.
- + Đo hàm lượng protein trong dịch chiết bằng phương pháp Bradford: cân khoảng 25-30 µg protein/ mẫu cho một giếng chạy điện di đứng.
- + Chạy điện di protein:
 - Thiết lập bộ điện di và cho vào dung dịch đệm 1X SDS (Tris 3g, Glycin 19g, SDS 1g)
 - Nhỏ của dịch đã xử lý trên (khoảng 30 µg protein/mẫu) vào mỗi giếng. Chạy ở 150 volt trong 2 giờ.
- + Chuyển protein từ gel vào màng Nitrocellulose:
 - Sau khi chạy điện di xong lấy gel ra khỏi bộ điện di.
 - Ngâm gel trong dung dịch chuyển khoảng 15 phút.
 - Đặt gel trong xô chuyển theo thứ tự: 2 miếng giấy thấm Whatman, gel protein, màng Nitrocellulose và 2 miếng giấy thấm Whatman.
 - Chạy ở 100 volt trong 1 giờ.
- + Rửa màng và kết dính:
 - Rửa màng trong dung dịch tách chiết mẫu (PBS) trong 5 phút.
- + Kết dính với kháng thể:
 - Ngâm màng dung dịch kết dính PBS chứa bột sữa và Tween 20 trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 1 giờ.
 - Tiếp tục ngâm lắc nhẹ màng trong dung dịch kết dính PBS chứa kháng thể thứ nhất gen Bt khoảng 1 giờ.
 - Rửa màng trong dung dịch kết dính PBST (PBD chứa bột sữa và Tween) 3 lần trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 10 phút/lần.
 - Ngâm lắc nhẹ màng trong dung dịch kết dính PBS chứa kháng thể thứ hai (alkaline phosphatase) khoảng 1 giờ.
 - Rửa màng trong dung dịch kết dính PBST (PBD chứa bột sữa và Tween) 3 lần trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 10 phút/lần.
- + Hiện màu:
 - Ngâm màng vào dung dịch alkaline phosphatase. Khi xuất hiện màu xong thì dừng

phản ứng bằng cho màng vào dung dịch kết dính PBS chứa EDTA.

- Rửa màng bằng nước cất và chụp ảnh ngay.

1.3. Xác định nồng độ kháng sinh chuẩn để sàng lọc các hạt bông T1 chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm

1.3.1. Mục đích

Hoàn thiện quy trình sàng lọc cây bông chuyển gen bằng gieo hạt trong ống nghiệm, áp dụng để chọn lọc các dòng bông chuyển gen sau vi tiêm.

1.3.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Các giống bông gốc C118, D16-2, LRA, SB1, TM1, VN36P, 254 do Viện nghiên cứu cây Bông và Cây có sợi cung cấp.

Các bước tiến hành

Khử trùng hạt: Hạt giống bông SSR60 và VN36P đã đốt lông áo bằng axit H_2SO_4 đậm đặc, được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 2 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% trong 20 phút và rửa 5 lần bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng thấm khô hạt bằng giấy lọc khử trùng, tách vỏ và đặt hạt trên các môi trường kháng sinh chọn lọc.

1.3.3. Kết quả

Chọn nồng độ lần 1:

Môi trường cho chọn lọc: MSO (môi trường cơ bản của) + Lượng Hyromicin tương ứng.

Nồng độ Hyromicin Stock 84mg/ml

CT1: 50mg/L môi trường

CT2: 30mg/L

CT3: 20mg/L

CT4: 10mg/L

CT5: 5mg/L

Đ C: 0mg/L

7 ngày sau khi đặt hạt, chúng tôi theo dõi tỷ lệ nảy mầm của hạt ở các công thức khác nhau kết quả thu được ở Bảng 1.

Ở những nồng độ kháng sinh thấp không ảnh hưởng tới khả năng nảy mầm của hạt. Tuy nhiên ở nồng độ từ 30 - 50mg/l, tỷ lệ nảy mầm của hạt đã giảm đáng kể. Như vậy, kháng sinh có ảnh hưởng xấu tới khả năng nảy mầm của hạt đặc biệt ở những nồng độ cao. Tiếp tục theo dõi khả năng ra rễ ở các công thức khác nhau sau 21 ngày kết quả thu được ở Bảng 2.

PHỤ LỤC 1. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ CÂY CHUYỂN GEN

Bảng 1. Tỷ lệ nảy mầm của các giống bông sau 7 ngày chọn lọc lần 1 (%)

Tên giống	Công thức					
	0mg/L	5mg/L	10mg/L	20mg/L	30mg/L	50mg/L
C 118	100	100	100	100	91,7	80
D 16-2	100	100	100	98,5	92	89,5
LRA	100	100	100	100	100	95
SB1	100	100	100	100	90,3	82
TM1	100	100	100	100	87	68,3
VN36P	100	100	100	100	98,3	72
254	100	100	100	100	98,6	91,7

Bảng 2. Tỷ lệ ra rễ của các giống bông sau 21 ngày chọn lọc lần I (%)

Tên giống	Công thức					
	0mg/L	5mg/L	10mg/L	20mg/L	30mg/L	50mg/L
C 118	100	85	61,7	0	0	0
D 16-2	100	82,5	59,7	0	0	0
LRA	100	93,3	65	0	0	0
SB1	100	90,3	65,3	0	0	0
TM1	100	96,7	51,2	0	0	0
VN36P	100	92	53,3	0	0	0
254	100	95,8	65,3	0	0	0

Kháng sinh Hygromycin làm giảm khả năng ra rễ của cây bông và có sự khác biệt lớn giữa các mức nồng độ. Đây là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng kháng kháng sinh của cây bông chuyển gen. Từ ngưỡng nồng độ 20mg/l cây bông không còn khả năng ra rễ với tất cả các giống bông.

Sau khi chọn lọc lần 1 chúng tôi thấy nồng độ kháng sinh Hygromycin nhỏ nhất gây ức chế khả năng ra rễ của cây bông là 20mg/l môi trường. Tuy nhiên, khoảng cách nồng độ giữa-CT2 (10mg/l) và CT3 (20mg/l) cao do đó tích chính xác chưa cao. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục chọn lọc lần hai với các ngưỡng nồng độ từ 10mg/l đến 20mg/l

Chọn nồng độ lần 2: Sau khi chọn lọc lần 1 chúng tôi lựa chọn nồng độ trong khoảng 10-20mg/L cho chọn lọc lần 2.

Môi trường cho chọn lọc: MSO (môi trường cơ bản của) + Lượng Hyromicin tương ứng.

Nồng độ Hyromicin Stock 84mg/ml

Với hai giống TM1, VN36P có tỷ lệ ra rễ tương đương nhau và thấp hơn hẳn so với các giống khác ở công thức 2 (30mg/l). Vì vậy, chúng tôi sử dụng các nồng độ sau

CT1: 11,5 mg/L

CT2: 13,5 mg/L

CT3: 15,5 mg/L

CT4: 18,5 mg/L

Đ C: 0 mg/L

Với các giống LRA, 254, SB1, C118, D16-2.

CT1: 11,5 mg/L

CT2: 13,5 mg/L

CT3: 14,5 mg/L

CT4: 16,5 mg/L

CT5: 18,5 mg/L

Đ C: 0mg/L

Sau 7 ngày đánh giá tỷ lệ nảy mầm, sau 21 ngày đánh giá tỷ lệ ra rễ.

Bảng 3. Tỷ lệ nảy mầm, giống TM1 và VN36P Sau 7 ngày chọn lọc lần II (%)

Chỉ tiêu	Tên giống	Công thức				
		0mg/L	11,5mg/L	13,5mg/L	15,5mg/L	18,5mg/L
% Nảy mầm	TM1	100	100	93,3	91,7	91,7
	VN36P	100	100	90	81,7	83,3
% Ra rễ	TM1	100	16,7	0	0	0
	VN36P	100	25	0	0	0

Bảng 4. Tỷ lệ nảy mầm, ra rễ giống C118, D16-2, LRA, SB1, 254 Sau 7 ngày chọn lọc lần II (%)

Chỉ tiêu	Tên giống	Công thức					
		0µl/L	11,5mg /L	13,5mg /L	14,5mg/L	16,5mg/L	18,5mg/L
% Nảy mầm	C 118	100	100	97,2	91,7	94,4	88,9
	D 16-2	100	100	93,1	91,7	91,7	88,9
	LRA	100	100	96,7	90	91,7	90
	SB1	100	100	88,8	87,5	88,8	83,3
	254	100	100	100	94,4	91,7	91,7
% Ra rễ	C 118	100	32	12,5	0	0	0
	D 16-2	100	27,8	8,3	0	0	0
	LRA	100	45	15	0	0	0
	SB1	100	33,3	9,7	0	0	0
	254	100	28	11,1	0	0	0

Kháng sinh Hygromycin ảnh hưởng xấu tới khả năng nảy mầm của hạt bông tuy nhiên chỉ thể hiện rõ ở những nồng độ cao. Tỷ lệ ra rễ là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng kháng Hygromycin của cây bông. Chúng tôi sử dụng khả năng ra rễ của cây bông trên

môi trường Hygromycin để chọn lọc các dòng bông chuyển gen sau này



Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ kháng sinh khác nhau tới sinh trưởng của cây bông

1.3.4.. Kết luận

Sau khi đánh giá tỷ lệ ra rễ chúng tôi lựa chọn được nồng độ cho chọn lọc các dòng bông là: Giống TM1, VN36P sử dụng 13,5 mg/L; giống LRA, D16-2, 254, SB1, C118 sử dụng nồng độ 14,5 mg/L. Đây là ngưỡng nồng độ nhỏ nhất không gây chết cây và làm ngừng khả năng ra rễ.

2. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ CÂY CHUYỂN GEN Ở QUY MÔ NHÀ LƯỚI

2.1. Thử nghiệm sinh học tính kháng đối với rầy nâu

2.1.1. Vật liệu

- Dụng cụ nuôi rầy (lồng, khay, chậu nhỏ, thuốc trừ nấm...).
- Dụng cụ thanh lọc rầy (lồng kính, khay nhỏ, pen, thước, thẻ nhỏ...).
- Giống lúa Tài Nguyên mùa làm thức ăn cho rầy (30 - 45 ngày tuổi).
- Giống Ptb 33 làm giống chuẩn kháng, giống TN1 làm chuẩn nhiễm.
- Các dòng lúa chuyển nạp gen cần thanh lọc.

2.1.2. Phương pháp

Thanh lọc theo phương pháp hộp mạ của IRRI, có chỉnh sửa cho phù hợp với điều kiện của nước ta.

Giống được ngâm ủ nhú mầm, cấy trong khay bùn mịn thành hàng, 5 lần nhắc lại kể cả TN1 và Ptb 33.

Thả rầy đồng (cùng) tuổi 2 hoặc 3 khi cây mạ 2 hoặc 3 lá (2-4 ngày sau khi cấy) với mật số 4 đến 6 con/tép. Đánh giá khi giống chuẩn nhiễm cháy rụi ở cấp 9 (7 đến 10 ngày sau khi thả rầy), theo thang điểm cấp 9 của IRRI.

2.2. Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scirpophaga incertulas*

của các dòng lúa biến đổi gen Bt

2.2.1. Vật liệu

- Giống chuẩn kháng W1263, IR 62 và chuẩn nhiễm IR29.
- Các dòng lúa chuyển nạp gen Bt ở thế hệ T1 và T3
- Vợt bắt bướm, bóng đèn điện, lồng nhựa lớn để nuôi bướm lấy trứng.
- khay to lớn. Lồng nhựa nhỏ dùng trong thử nghiệm.
- Hộp nhựa (= 6cm) để ủ trứng nở, cọ nhỏ dùng bắt sâu non.
- Chậu sành (= 15cm) trồng các dòng giống lúa cần thử nghiệm.
- Phân bón cho lúa thử nghiệm .

2.2.2. Phương pháp trồng lúa và nuôi sâu

Các dòng lúa thử nghiệm được trồng trong chậu nhựa nhỏ đường kính 15cm, 3 chậu/dòng, cấy ở tuổi mạ 15 ngày và thử nghiệm ở giai đoạn 30 ngày sau khi cấy (Hình 2). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại trong 3 khay tôn kích thước 1.2 x 2.4 x 0.2 m.



Hình 2 . Trồng các dòng lúa thử nghiệm



Hình 3a. Bướm sâu đục thân hai chấm được nuôi trong nhà lưới



Hình 3b. Lồng nuôi bướm sâu đục thân



Hình 3c. Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi



Hình 3d. Trứng sâu đục thân lấy từ bướm nuôi



Hình 3e. Sâu đục thân nở (sau 7 ngày tạo ra sâu con)

Bướm sâu đục thân được bắt vào buổi tối dưới bóng đèn điện bằng ống nghiệm. Bướm được nuôi cho đẻ trứng trong lồng nhựa có đặt sẵn lúa 30 ngày tuổi. Bướm đẻ trứng sau 1 - 2 ngày và nở sau 5 - 7 ngày. Lúa có ổ trứng được thu cho vào hộp nhựa có lót giấy thấm ủ 2 ngày trước khi trứng nở.

Quy trình nuôi sâu được trình bày từ Hình 3a-e.

Phương pháp thử nghiệm đĩa petri

- Cắt đoạn thân (7 cm) cho vào đĩa petri có lót giấy lọc ẩm (3 lần lặp lại cho mỗi dòng).
- Thả 5 sâu mới nở vào mỗi đĩa, dán kín bằng parafilm để tránh sự thất thoát sâu.
- Cho đĩa petri vào phòng có nhiệt độ 25^o C.
- Tách thân lúa để quan số sâu sống, chết hoặc thất thoát sau 4 ngày lây nhiễm.

Phương pháp thử nghiệm toàn cây

Cây được chọn 10 chồi, 3 lần lặp lại cho mỗi dòng. Mỗi cây được chủng với 10 con sâu mới nở, 1 sâu/chồi và được cho vào lồng để tránh sâu thoát.

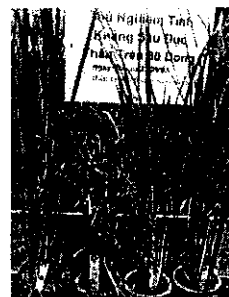
Chỉ tiêu theo dõi gồm:

- Đếm số chồi héo do sâu đục vào các ngày : 5,10,15 và 20 sau khi thả sâu. Tính tỷ lệ héo đọt (Hình 4b).
- Tính tỷ lệ sâu sống trên mỗi dòng vào ngày thứ 25 sau chủng sâu bằng cách: Cắt sát gốc cây lúa thử nghiệm để dễ tách đếm sâu sống hay nhộng trên mỗi dòng giống.
- Cân trọng lượng sâu ngay sau khi đếm sâu sống của từng dòng với 3 lần nhắc lại (3 chậu).
- Cấp hại của sâu đục thân trên các dòng trắc nghiệm được đánh giá theo thang điểm (IRRI) dựa trên tỷ lệ chồi chết như sau:

Tỷ lệ chết đọt	Cấp	Phản ứng
0%	0	Rất kháng (RK)
1 - 10%	1	Kháng (K)
11 - 20%	3	Hơi kháng (HK)
21 - 30%	5	Hơi nhiễm (HN)
31 - 60%	7	Nhiễm (N)
> 60%	9	Rất nhiễm (RN)



Hình 4a. Thử nghiệm tính kháng trong đĩa petri



Hình 4b. Thử nghiệm tính kháng toàn cây

PHỤ LỤC 2.

Các trình tự nucleotit của các gen phân lập

Phụ lục 2.

TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CÁC GEN PHÂN LẬP

2.1. Trình tự nucleotit của gen Pi-2t

C101A51	--TGTTTGAGCTCTCCAATGCCTGTTCTTATACGTAGTACTCCCTCCATNTCCAAAATAT
C101A51DC	GTTGTTTGAGCCCTCCAATGCCTGTTCTTATACGTAGTACTCCCTCCATT-CCAAAATAT

C101A51	ATGATGCCGTTGACTTTTCGTATAATGTTTGATTACTTGTCTTTTACAAATAAAATTATA
C101A51DC	ATGATGCCGTTGACTTTTCGTATAATGTTTGATTACTTGTCTTTTACAAATAAAATTATA

C101A51	TAAATATTATTTATTTTATGACTTATTTGATTATCAAATAGTTGTACATATTTATAC
C101A51DC	TAAATATTATTTATTTTATGACTTATTTGATTATCAAATAGTTGTACATATTTATAC

C101A51	AAATTCGTTTTTAATAAGATAAATCGTCAAATGTTACGAGAAAAATCAACGGTGTTATAT
C101A51DC	AAATTCGTTTTTAATAAGATAAATCGTCAAATGTTACGAGAAAAATCAACGGTGTTATAT

C101A51	ATTTTGAACGGAGGTAGTACTACATAAGCACAACTAAAATTTGTTTATATGAGAATGT
C101A51DC	ATTTTGAACGGAGGTAGTACTACATAAGCACAACTAAAATTTGTTTATATGAGAATGT

C101A51	GCAGCCGTCACCATAGATATGATTCGGTGCTATGGC-ATATTAGCACCATATAAATATTA
C101A51DC	GCAGCCGTCACCATAGATATGATTCGGTGCTATGGCGATATTAGCACCATATAAATATTA

C101A51	CAATCAAACATCTTCTGAACAACACACCAATTTATTTCTTTGATAAAATCGCACACAAA
C101A51DC	CAATCAAACATCTTCTGAACAACACACCAATTTATTTCTTTGATAAAATCGCACACAAA

C101A51	TTATTTGCTCGACTATGCTGTAGCAGAGATCTATGCCTCTCTGCAAAGTATCTTGTCACT
C101A51DC	TTATTTGCTCGACTATGCTGTAGCAGAGATCTATGCCTCTCTGCAAAGTATCTTGTCACT

C101A51	ATTCTGACAAGAGAGTAAAGCCTTAAATATAGCCTGGCATATATAATTATGTTCTTGCTA
C101A51DC	ATTCTGACAAGAGAGTAAAGCCTTAAATATAGCCTGGCATATATAATTATGTTCTTGCTA

C101A51	TTCACTGTATGCACGCGCACTAATTAGTTATGAAAACGCGTGTGTATGCTAAGAGCTTGT
C101A51DC	TTCACTGTATGCACGCGCACTAATTAGTTATGAAAACGCGTGTGTATGCTAAGAGCTTGT

C101A51	ACTGTATTTCTAACCAAAAAAAAAAATG-TTAACAAACCTAACATATATGCTAACTTGTGC
C101A51DC	ACTGTATTTCTAACCAAAAAAAAAAATG-TTAACAAACCTAACATATATGCTAACTTGTGC

C101A51	CAACTCAACAGCCCCCTACGAGATGACATGGTTTCCCATGCTCCACAGCATGTACCACGCC
C101A51DC	CAACTCAACAGCCCCCTACGAGATGACATGGTTTCCCATGCTCCACAGCATGTACCACGCC

C101A51	TAGAGCTAGAGGTAACCATAAGATGCAGGCCGTTGTGT--ACCTGACCTTGTGAGTGTTG
C101A51DC	TAGAGCTAGAGGTAACCATAAGATGCAGGCCGTTGTGTGTACCTGACCTTGTGAGTGTTG

C101A51	TGTTGATCGATCACCATAGCATGTGCTCCACCCTGCCTCCATCACCATCTCTACTCTGAA
C101A51DC	TGTTGATCGATCACCATAGCATGTGCTCCACCCTGCCTCCATCACCATCTCTACTCTGAA

C101A51	GCTGACATGACCAACTGTTACACATGCGGCATCACTAGAGCTGAGGTGACCATCTGACCA
C101A51DC	GCTGACATGACCAACTGTTACACATGCGGCATCACTAGAGCTGAGGTGACCATCTGACCA

C101A51	AAGCTGATAGCCTGCCTTGGTGCGAACGCCTTTTGGACAGCATCCATGGACTCTGTGTTG
C101A51DC	AAGCTGATAGCCTGCCTTGGTGCGAACGCCTTTTGGACAGCATCCATGGACTCTGTGTTG

C101A51	GTACAGAAGTGGTTGCTCATACTTCTTGTTAGTGCAAGTAACTTCTATTGGCAGAATGTA
C101A51DC	GTACAGAAGTGGTTGCTCATACTTCTTGTTAGTGCAAGTAACTTCTATTGGCAGAATGTA

C101A51	TTTTTGTTCCTCGATTGATGCCTCCTAGCCCTGGCCGTACATTGCACTGCAG
C101A51DC	TTTTTGTTCCTCGATTGATGCCTCCTAGCCCTGGCCGTACATTGCACTGCAG

Hình 2.1. So sánh trình tự nucleotit của giống lúa C101A51 với trình tự đã công bố

2.2. Trình tự nucleotit của gen Pi-1t

C101Lac	ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGNNNAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGN
Tetep	ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGAAAAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGA *****
C101Lac	NNCGACCCCTGTTGCCAAGAAGCTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT
Tetep	CCCGACCCCTGTTGCCAAGAAGCTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT *****
C101Lac	TANNNCTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAATTATTTCTCCTTTTTATGTTT
Tetep	TAAAACTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAATTATTTCTCCTTTTTATGTTT ** *****
C101Lac	TCTCTTTGTTCTGTGTATCAGATCGCGCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT
Tetep	TCTCTTTGTTCTGTGTAGNNGATCGCCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT ***** *****

Hình 2.2. Trình tự gen kháng đạo ôn Pi-1 từ giống lúa Tẻ tép so với trình tự nucleotit trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế (C101Lac)

2.3. Trình tự nucleotit của gen vip3

*Bam*HI

vip3_15_RE
 vip3a

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 GCGGATCCAT GAACAAGAAT AATACTAAAT TAAGCACAAG AGCCTTACCA AGTTTTATTG ATTATTTTAA TGGCATTAT GGATTGCCA CTGGTATCAA AGACATTATG

vip3_15_RE
 vip3a

120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220
 AACATGATTT TTAAAACGGA TACAGGTGGT GATCTAACCC TAGACGAAAT TTAAAGAAT CAGCAGTTAC TAAATGATAT TTCTGGTAAA TTGGATGGGG TGAATGGAAG

vip3_15_RE
 vip3a

230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330
 CTTAAATGAT CTTATCGCAC AGGGAACTT AAATACAGAA TTATCTAAGG AAATATTAAA AATTGCAAAT GAACAAAATC AAGTTTTAAA TGATGTTAAT AACAACTCG

vip3_15_RE
 vip3a

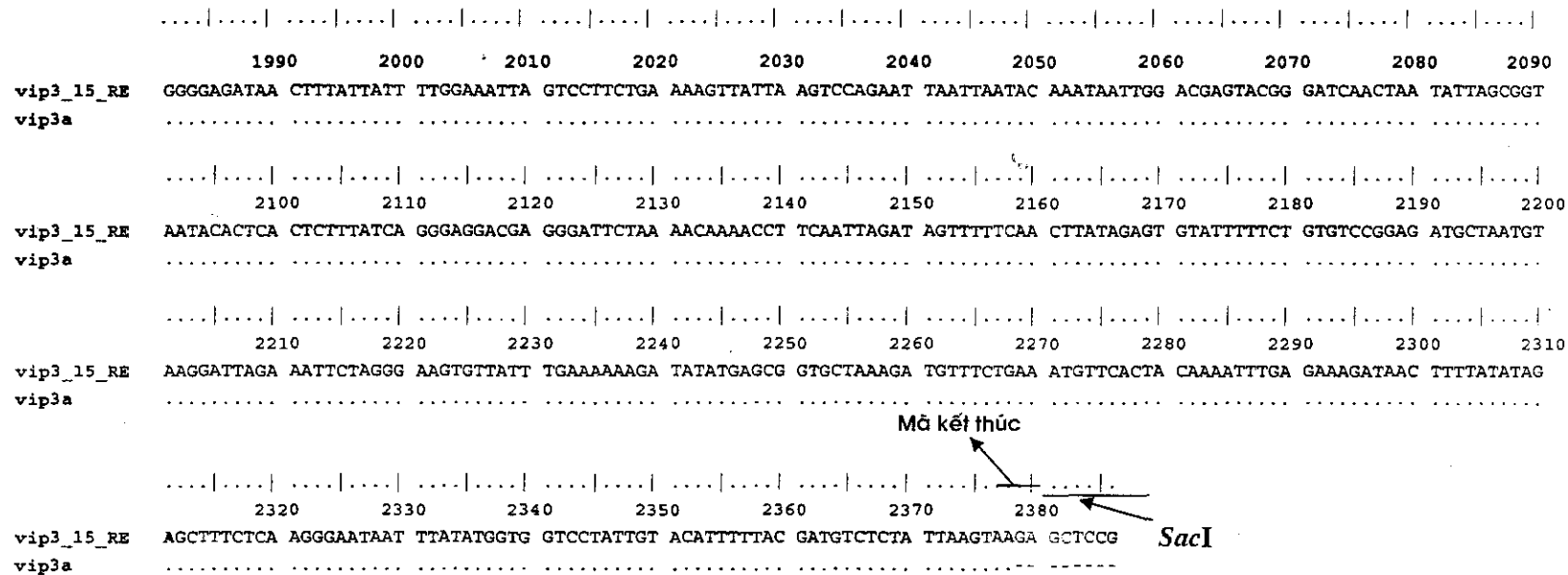
340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440
 ATGCGATAAA TACGATGCTT CGGGTATATC TACCTAAAAT TACCTCTATG TTGAGTGATG TAATGAAACA AAATTATGCG CTAAGTCTGC AAATAGAATA CTTAAGTAAA

vip3_15_RE
 vip3a

450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550
 CAATTGCAAG AGATTTCTGA TAAGTTGGAT ATTATTAATG TAAATGTACT TATTAAGTCT AACTTACTG AAATTACACC TGCATATCAA AGGATTAAAT ATGTGAACGA

vip3_15_RE
 vip3a

560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660
 AAAATTTGAG GAATTAACCT TTGCTACAGA AACTAGTTCA AAAGTAAAAA AGGATGGCTC TCCTGCAGAT ATTCTTGATG AGTTAACTGA GTTAAGTAA CTAGCGAAAA



Hình 2.3. Trình tự nucleotit gen *vip3* chúng tôi phân lập được với gen *vip3A* trong ngân hàng gen quốc tế

PHỤ LỤC 3.

Các công trình công bố liên quan đến Đề tài

NHỮNG KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN *ANTI-ACO* VÀO CÂY HOA CÚC

Nguyễn Thị Lan Hoa, Đoàn Thị Hoà,
Đặng Trọng Lương, Vũ Đức Quang, Phí Công Nguyên,
Đặng Thị Minh Trang, Đỗ Minh Huy

Initial results of transfer an *Anti-ACO* gene into *Chrysanthemum* via *Agrobacterium tumefaciens*

SUMMARY

The *Agrobacterium* – mediated is the transformation method was used to introduce *np11* gene and *anti* – ACO gene into the nucleus of *Chrysanthemum*. Leaf disk or leaf segment of *chrysanthemum* was genetically transformed via *Agrobacterium tumefaciens* carrying plasmid DNA (p2300) contains *np11* and *anti-ACO* genes. Both of them were controlled by 35S promoter. Selection for transformed cells was accomplished using Kanamycin as a selectable marker. Regenerated shoots were then induced from the Kanamycin resistance tissues, and transgenic plantlets were produced. The presence of the introduced gene in the transformed *chrysanthemum* plants was confirmed by PCR and Southern blot analysis. The recovered transgenic plants were established in soil and acclimatized in the green house.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhờ thành tựu của ngành Công nghệ sinh học nói chung và Công nghệ gen nói riêng nên trong hơn một thập kỷ qua nhiều gen quý đã được chuyển vào một số loại cây trồng nhằm tạo ra những cây trồng mang các gen có những đặc tính mong muốn. Chỉ trong vòng 15 năm phát triển, các nhà khoa học trên thế giới đã tạo ra hơn 60 loài cây trồng khác nhau mang những gen ngoại lai đặc trưng có các đặc tính quan trọng như: kháng sâu bệnh, chịu thuốc trừ cỏ, kháng thuốc trừ sâu Bt, chịu lạnh.

Ở Việt Nam, một số viện nghiên cứu (Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện lúa Đồng bằng sông Cửu long...) đã có những thành tựu công nghệ gen đáng ghi nhận, tạo ra các cây trồng chuyển gen như: lúa mang gen kháng bệnh bạc lá (Phan Tổ Phụng và cs.), các cây họ cải mang gen kháng sâu và kháng chất diệt cỏ (Đặng Trọng Lương và cs.)... Bên cạnh một số cây lương thực và cây rau được biến đổi gen, việc nghiên cứu chuyển gen vào đối tượng cây hoa cũng cần được quan tâm. Vì thế chúng tôi tiến hành chuyển gen *anti-ACO* vào giống hoa cúc vàng (HCV1) nhằm kéo dài tuổi thọ hoa cắt của cây hoa này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

♦ Giống hoa cúc HCV1, hoa màu vàng sáng, đang được ưa chuộng.

♦ Chúng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58 chứa Plasmid p 2300 – *anti* - ACO có chứa gen kháng Kanamycin và gen *anti* - ACO có cấu trúc 35S pro > *anti* - ACO > Noster > 35S pro > *np11* nằm xen giữa hai đoạn trình tự viên vùng T-ADN. Vector này được nhận từ Viện Công nghệ Sinh học.

2. Phương pháp nghiên cứu

* Nuôi cấy mô lá hoa cúc

Môi trường nuôi cấy được sử dụng dựa trên môi trường cơ bản của Murashig và Skoog (1962) (MS) có bổ sung 15% nước dừa và các chất kích thích sinh trưởng: Kinetin (KIN), BAP (6-Benzyl aminopurin), NAA (Naphthyl acetic acid).

Môi trường tái sinh chồi trực tiếp từ lá (R6): MS+ BAP 2mg/l + NAA 1mg/l +15% nước dừa + agar 7%.

Môi trường nhân chồi: MS + KIN 1mg/l + NAA 0,01mg/l + 15% nước dừa + agar 7%.

Môi trường kéo dài chồi và tạo rễ: 1/2 MS + NAA 0,1mg/l + agar 7%.

*** Chuẩn bị mẫu và tiền nuôi cấy trước khi biến nạp**

Lá non *in vitro* được cắt nhỏ thành kích thước 1 × 1cm. Mẫu lá được đặt trên môi trường R6 đặc không có kháng sinh. Nuôi 2-3 ngày trong điều kiện nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 16h/ngày, dùng làm nguyên liệu cho biến nạp.

*** Phương pháp biến nạp**

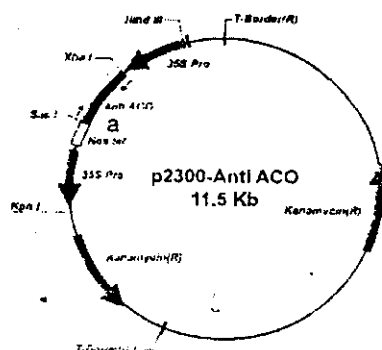
Vi khuẩn *Agrobacterium* được nuôi cấy theo phương pháp của Nancy L. Mathis và Maud A. Whinchee (Mỹ).

Ly tâm dịch nuôi để thu lấy tế bào vi khuẩn. Hoà loãng tế bào vi khuẩn trong dịch biến nạp (R6 lỏng không kháng sinh, bổ sung 50μM Acetosiringone) đạt khoảng 1×10^8 tế bào/ml, dùng dịch này cho biến nạp. Tiến hành lây nhiễm mẫu đã xử lý tiền nuôi cấy với vi khuẩn *Agrobacterium*. Quá trình đồng nuôi cấy kéo dài 2 ngày trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng như tiền nuôi cấy. Sau đó, cấy mẫu lên môi trường R6 đặc có bổ sung Claforan 250mg/l để tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá đã biến nạp. Sau khi chồi được 15 ngày tuổi, cấy chuyển các cụm chồi sang môi trường R6 có bổ sung 50mg/l Kanamycin để chọn lọc.

*** Kiểm tra sự có mặt của các gen ngoại lai có trong cây**

Kiểm tra sự biểu hiện của gen *nptII*: Sự biểu hiện của gen *nptII* được kiểm tra bằng cách nuôi cấy chồi cúc trên môi trường có chứa 50mg/l Kanamycin. Nếu chồi cúc sống được trên môi trường có chứa hàm lượng Kanamycin như vậy chứng tỏ những chồi này đã mang gen *nptII*.

Kiểm tra sự có mặt của promoter 35S trong hệ gen của cây cúc chuyển gen bằng phương pháp PCR: Phản ứng PCR được thực hiện trong 25μl hỗn hợp phản ứng chuẩn với enzyme Taq-ADN polymerase và cặp mồi của promoter 35S khuếch đại đoạn ADN có kích thước 195bp. Điện di sản phẩm PCR trên gel Agarose 2%, so sánh với băng chuẩn và marker 1kb.



Cấu trúc Plasmid P2300

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nuôi cấy mô lá hoa cúc

Để chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* có thể sử dụng tất cả các bộ phận của cây: mẫu rễ và thân..., tuy nhiên đối với cây hoa cúc thì lá là một nguồn tế bào tái sinh thích hợp để chuyển gen quan tâm. Để thăm dò khả năng tái sinh của mẫu lá đã sử dụng môi trường MS có các tổ hợp phytohormon khác nhau, với các giống cúc HCV1, HCT1, HCT2, HCD1 và nhận thấy BAP và NAA có ảnh hưởng rất tích cực đến quá trình phát sinh chồi cúc giống HCV1. Thí nghiệm thăm dò ảnh hưởng của các tổ hợp này đến khả năng tái sinh trực tiếp từ mẫu lá được tiến hành trên 12 tổ hợp, 50 mẫu/tổ hợp, theo dõi và đánh giá sau 15 ngày nuôi cấy.

Bảng 1: Ảnh hưởng của các tổ hợp (NAA và BAP) đến tỷ lệ tái sinh từ mẫu lá

BAP(mg/l) \ NAA(mg/l)	1,0	2,0	3,0
0,5	-	-	-
1,0	-	94%	-
1,5	-	24%	48%
2,0	-	-	64%

Kết quả thí nghiệm cho thấy, có 4 tổ hợp cho khả năng tái sinh trong khoảng thời gian sau 15 ngày. Ở những tổ hợp khác, mẫu chỉ tạo callus mà chưa tái sinh được. Giống HCV1 có phản ứng khả quan đặc biệt với tổ hợp BAP 2mg/l và NAA 1mg/l, chồi xuất hiện ở vết cắt chỉ sau 8-10 ngày với tỷ lệ tạo chồi đạt rất cao tới 94%, số chồi/mẫu trung bình đạt 14-16 chồi. Quan sát sau 5 ngày nuôi cấy cho thấy mẫu lá đã phát triển rõ rệt do có sự tăng sinh về khối lượng, kích thước tăng từ 20-30%. Sau 6-8 ngày xuất hiện tế bào hình cầu và bật chồi sau 9-10 ngày.

Từ kết quả trên cho thấy môi trường R6 (MS + 3% Sucrose + 15% nước dừa + BAP 2mg/l + NAA 1mg/l + agar 7%) là thích hợp nhất để tái sinh chồi trực tiếp từ bề mặt cắt của lá giống hoa cúc HCV1.

Chồi được cấy lên môi trường MS có chứa NAA 0.1mg/l để tạo rễ, rễ bắt đầu xuất hiện sau 7 ngày. Qua quan sát cho thấy, sau 2 tuần độ dài rễ đạt 3-4 cm, rễ trắng khỏe, số rễ trung bình/cây đạt từ 6-7 rễ. Đây là môi trường thích hợp có thể sử dụng để ra rễ giống cúc này.

Cây hoàn chỉnh được đưa ra cát với tỷ lệ sống là 95-100%. Sau khi bộ rễ đã hoàn

thiện, cây được trồng ra đất với tỷ lệ sống là 95%.

2. Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Dựa vào bản chất tự nhiên của vi khuẩn *Agrobacterium* chỉ nhiễm vào các tế bào bị thương đang phân chia mạnh, nên trong thí nghiệm đã cắt lá cúc non có kích thước 1x1cm để lấy nhiễm. Tuy nhiên sau 2 ngày đồng nuôi cấy, nhiều mẫu biến nạp gặp nút không có khả năng tái sinh, tỷ lệ lên tới 62% (bảng 2), còn đa số các mẫu còn lại đều bị chết đen các tế bào mép lá (ảnh 1). Những mẫu này cũng không có khả năng tái sinh chồi từ mép lá. Để khắc phục hiện tượng này, đã tiến hành thí nghiệm xử lý tiền nuôi cấy để thăm dò phản ứng của mẫu với quá trình lây nhiễm, đối chứng là mẫu lây nhiễm với vi khuẩn không qua tiền nuôi cấy.

Những mẫu lá non có kích thước khoảng 1x1cm được cấy lên môi trường tái sinh R6 với thời gian khác nhau (từ 1-3 ngày), thời gian tiền nuôi cấy được giới hạn 1-3 ngày với lý luận là trong giai đoạn này tế bào phân chia mạnh tạo ra sinh khối lớn và chưa biệt hoá, thuận lợi cho việc chuyển gen.

Bảng 2: Ảnh hưởng của tiền nuôi cấy đối với sức sống của mẫu sau lây nhiễm
(Tiến hành thí nghiệm 100 mẫu đối với 1 công thức)

Công thức	Số ngày xử lý TNC	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ chết đen mặt cắt (%)	Tỷ lệ tái sinh từ mặt cắt (%)
1	1 ngày	45	34	21
2	2 ngày	23	25	52
3	3 ngày	11	5	84
4	Đối chứng	62	29	9

Thí nghiệm cho thấy thời gian tiền nuôi cấy càng dài thì mẫu càng khỏe hơn: bản lá to, dày và xốp hơn. Với mẫu tiền nuôi cấy 1-2 ngày, khi tiến hành gây vết thương mới và lây nhiễm, tỷ lệ chết vẫn cao (23-45%), tỷ lệ chết đen mặt cắt lên đến 25-34% tuy có

giảm hơn so với đối chứng (62-29%). Kết quả tốt nhất là thí nghiệm có xử lý TNC 3 ngày trước khi lây nhiễm với tỷ lệ chết giảm còn 11% và tỷ lệ chết đen tế bào mặt cắt chỉ còn 5%.



Mẫu xử lý TNC

Mẫu đối chứng

Ảnh 1: Mẫu được xử lý tiền nuôi cấy và đối chứng

Sau khi xử lý TNC, tiến hành gây vết thương mới và lây nhiễm với vi khuẩn. Quá trình đồng nuôi cấy kéo dài 2 ngày với sự có mặt của Acetosiringone 50mM như là một chất dẫn dụ sinh học. Chất này đóng vai trò là chất cảm ứng cho các gen Vir hoạt động. Quá trình này diễn ra trong điều kiện pH thấp và được tăng cường nhờ các opine và monosaccharide. Kết quả của quá trình này là một mạch đơn của T-ADN được cắt ra tại hai đầu trình tự viên và chuyển từ vi khuẩn sang tế bào thực vật với đầu 5' đi trước. Sau khi đã qua màng tế bào, đoạn mạch T đi vào nhân và kết hợp với ADN trong nhân ở vị trí ngẫu nhiên.

Chúng vi khuẩn *Agrobacterium* có mang vector là plasmid 2300 - *anti* - ACO có chứa gen *nptII* (Neomycin phosphotransferase II) và gen *anti*-ACO (anti amino cyclopropan carboxylic acid oxidase) thay thế một phần của T-ADN. Vì vậy, chúng có thể được chuyển vào tế bào lá hoa cúc trong quá trình biến nạp. Gen *nptII* và gen *anti* ACO cùng được điều khiển bởi promotor CAMV 35S. Theo nhiều tác giả, promotor này hoạt động

tốt trong bộ gen thực vật. Do vậy, ở những cây được biến nạp nếu biểu hiện kiểu hình, hai gen này sẽ cho hai tính trạng: một là kháng Kanamycin trong môi trường chọn lọc, hai là gen *anti*-ACO tạo ra protein ức chế quá trình tạo Ethylen nên giúp cho hoa lâu tàn.

Kháng sinh Kanamycin với nồng độ 50 mg/l được sử dụng làm yếu tố chọn lọc. Quá trình chọn lọc được tiến hành đối với những cụm chồi 15 ngày tuổi. Kháng sinh Kanamycin ức chế quá trình sinh tổng hợp protein ở thực vật cho nên sau 15 ngày đã xuất hiện nhiều chồi có biểu hiện bạch tạng. Sau 30 ngày ở lò đối chứng, tỷ lệ bạch tạng thu được là 100%. Nhiều chồi biến nạp biểu hiện rõ tính kháng kháng sinh, chồi phát triển bình thường: thân lá xanh tốt (ảnh 3). Tính kháng này có được là do tế bào có thể đã mang gen ngoại lai *nptII* được điều khiển bởi promotor CAMV35S. Khi promotor hoạt động, gen *nptII* sẽ mã hoá cho neomycin phosphotransferase (APH[3']-II) làm mất hoạt tính của kháng sinh nên cây vẫn phát triển được.



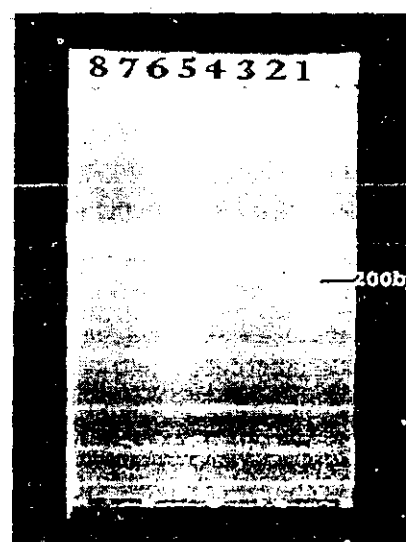
Chọn lọc lần 2

Chọn lọc lần 1

Ảnh 2: Chồi biến nạp và đối chứng trên môi trường chọn lọc (sau 4 tuần)

Tuy nhiên, thực vật đôi khi cũng có thể tồn tại trên môi trường khắc nghiệt trong một khoảng thời gian nhất định nào đó. Cho nên để xác định chắc chắn những cây này có mang gen ngoại lai hay không, đã sử dụng phương pháp PCR để phân tích. Gen CAMV 35S là promotor điều khiển sự hoạt động của gen *anti-ACO* và gen *nptII*. Để xác định sự có mặt của gen promotor này tiến hành làm phản ứng PCR với cặp mồi 35S1/35S2 để nhận một trình tự đặc trưng của nó. Nếu mẫu ADN của cây nào cho phản ứng dương tính (có băng) thì chứng tỏ gen promotor 35S đã được chuyển thành công vào cây hoa cúc. Sau khi thực hiện phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên gel Agarose và so sánh với marker 1kb xác định được các băng dài rõ nét khoảng 195bp đối với 14 mẫu ADN của cây cúc đã biến nạp. Các mẫu đối chứng đều không lên băng (ảnh 3).

Kết quả này có thể chứng minh rằng promotor CAMV35S cùng với cấu trúc đã có mặt trong cây cúc chuyển gen. Những cây này hiện đang được trồng trong điều kiện nhà lưới để theo dõi và tiếp tục đánh giá.



Ảnh 3: Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR với chất mồi của gen promotor 35S

1: Marker 1kb ladder, 2: Plasmid ART27
3: H₂O, 4: Đối chứng, 5,6,8: Cây chuyển gen, 7: Cây không được chuyển gen.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Đã bước đầu hoàn thiện quy trình chuyển gen *anti-ACO* vào cây hoa cúc HCV1.
2. Đã xác định được sự có mặt của promotor CAMV35S trong hệ gen cây biến nạp bằng phương pháp PCR.
3. Đã thu được 14 cây hoa cúc chuyển gen *nptII* và *anti-ACO*.
4. Đề nghị tiếp tục phân tích gen *anti-ACO* bằng kỹ thuật PCR, kỹ thuật lai Southern, lai Northern và các kỹ thuật khác để kiểm tra sự thể hiện của gen này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Doanh (1998). *Tổng quan về cây chuyển gen từ năm 1986-1997*. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
2. Trần Bích Lan, Nguyễn Đức Doanh và Cs (1998). *Kết quả bước đầu sử dụng Agrobacterium tumefaciens trong nghiên cứu chuyển gen vào lúa ở Việt Nam*. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
3. Đặng Trọng Lương, Nguyễn Đức Doanh và Cs, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng, Trần Duy Quý (1999). *Nghiên cứu chuyển gen CryIAc kháng sâu vào một số giống cải bắp (Brassica oleracea var. Capitata) qua Agrobacterium*. Báo cáo khoa học, Viện Di truyền Nông nghiệp.
4. Phan Tố Phương, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý, Phạm Thu Hằng, C.M. Clauder, S. Zang, L. Chen, R.N. Beachy (2001). *Chuyển gen kháng Hygromycin, gen GUS và gen kháng bệnh bạc lá Xa21 vào lúa bằng súng bắn gen*. Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000. Viện Di truyền Nông nghiệp.
5. Ausubel F. et al. (1989). *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates.
6. Clive James (1998). Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA. Briefs.
7. Nancy L. Mathis and Maud A.W. Hinchey (1994). *Agrobacterium inoculation techniques for plant tissue*. Crop Transformation. Monsanto Co. St. Louis, MO63198. USA.
8. Pual J.J. Hookykas, Teresa Mozo. *Agrobacterium molecular genetics. Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers. 1994. p1-9B3.
9. Stanton B. Gelvin, Chang - Nong Liu. *Genetic manipulation of Agrobacterium tumefaciens strains to improve transformation of recalcitrant plant species*. Plant molecular biology Manual. Kluwer Academic Publishers, 1994. p1-9B3.
10. Van Wordragen MF, Dons HIM (1992). *A.tumefaciens-mediated transformation of recalcitrant crops*. Plant Molecular Biology manual. Rep. 10: 12-36.

Chuyển nạp gen kháng sâu cry IAb và cry IAc

VÀO CÁC GIỐNG LÚA BẰNG PHƯƠNG PHÁP AGROBACTERIUM VÀ CHỌN LỌC MANNOSE

TRẦN THỊ CÚC HÒA*, LÊ TRẦN BÌNH**, BUI BÀ ĐÔNG***

Sâu đục thân là một trong những sâu hại chính trên lúa. Đối với loài sâu hại này, biện pháp phòng trừ bằng dùng giống kháng không đem lại kết quả vì Viện nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI) đã thanh lọc sinh trưởng sâu đục thân cho trên 30 nghìn giống lúa nhưng chưa tìm ra giống kháng. Vì vậy tạo giống lúa kháng sâu đục thân bằng công nghệ gen là phương pháp hiệu quả hơn, giúp tăng năng suất, tiết kiệm chi phí sản xuất, giảm lượng thuốc trừ sâu và giảm ô nhiễm môi trường.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm chuyển nạp gen kháng sâu cry IAb và cry IAc vào 3 giống lúa nhóm indica có chất lượng tốt (Millet Bui IR64 và K105) đang trồng ở Việt Nam bằng phương pháp sử dụng *Agrobacterium* và hệ thống chọn lọc mạt bằng mannose thay cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh được áp dụng phổ biến trong chuyển nạp gen cho đến nay. Điều này có ý nghĩa trong việc phát triển phương pháp tạo ra các dòng lúa biến đổi gen sạch, khắc phục các mối lo ngại về tính an toàn sinh học của cây biến đổi gen hiện nay.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế vector. Để tạo ra các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu bằng hệ thống chọn lọc mannose, chúng tôi đã thiết kế hai vector mạt là PUBB-Man và PUBC-Man (Hình 1).

Vector PUBB-Man được thiết kế bằng cách dùng vector pCaCar (mang gen chọn lọc gent) nhưng gen cri và pay trên vector này được cắt đi bằng enzyme NotI + BamHI và thay vào đó là ubiquitin promoter-cry IAb. Để thực hiện mục tiêu này, vector PUBB được cắt bằng enzyme HindIII + SpeI ra đoạn DNA 2.2 kb có mang ubiquitin promoter được chọn. Vector PUBC cũng được cắt với SpeI + BamHI để chọn đoạn DNA 1.9 kb có mang gen cry IAc. Hai đoạn DNA 2.2 kb và 1.9 kb được gắn đồng thời vào vị trí tương ứng HindIII và BamHI trên vector pCaCar. Vector PUBB-Man được chuyển vào tế bào khả nạp của *A. tumefaciens* chủng LBA 4404.

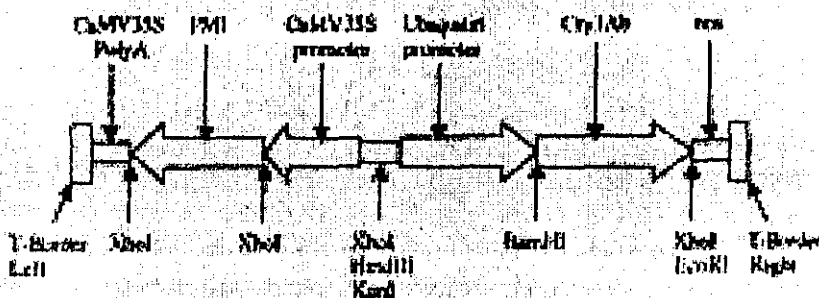
Vector PUBC-Man: được

thiết kế tương tự như trên, chỉ khác là gen cri và pay trên vector pCaCar được thay bằng ubiquitin promoter-cry IAc được cắt từ vector PUBC.

Giống lúa và phương pháp chuyển gen. Phôi non của giống lúa IR64 và phôi già từ hạt gạo Millet Bui và K105 được trích và nuôi cấy trên môi trường tảo mô sẹo. Chọn các mô sẹo có khả năng sinh phôi để chuyển vào khuẩn *A. tumefaciens* chủng LBA 4404. Chọn lọc được tiến hành cách nhau mỗi hai tuần trên môi trường MS có chứa 30 g/l sucrose và 25 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ nhất, 18 g/l sucrose và 25 g/l mannose ở vòng thứ hai và 8 g/l sucrose cộng với 35 g/l mannose ở vòng thứ ba. Các cây kháng mannose được kiểm tra lại bằng xét nghiệm chlorophenol red (CR) trước khi chuyển trồng ra đất.

Trích DNA và phân tích Southern. DNA được trích từ lá, 10 g DNA được cắt với EcoRI + BamHI (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen cry IAb đối với dòng lúa chuyển nạp bằng vector PUBB-Man và cắt với KpnI (một điểm cắt) để xác định số bản (copy). Tương tự DNA của các dòng lúa chuyển nạp bằng vector PUBC-Man được cắt đoạn với EcoRI + BamHI (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen cry IAc và cắt với KpnI (một điểm cắt) để xác định số bản. DNA cắt đoạn được chạy điện di qua 0,8% agarose gel trước khi chuyển bằng mạt điện và cố định trên màng nylon. Gen cry IAb và cry IAc được đánh dấu bằng DIG để dùng làm vệt dò lại (probe).

Thanh lọc tính kháng sâu đục thân của các dòng



HÌNH 1. Sơ đồ vector PUBB-Man. Vector PUBC-Man cũng tương tự, chỉ khác vị trí Cry IAb được thay bằng Cry IAc

(*) TS. Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long; (**) PGS. TS. Viện Công nghệ sinh học; (***) PGS. TS. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

NÔNG NGHIỆP - NÔNG THÔN - MÔI TRƯỜNG

lúa biến đổi gen *ory1Ab* và *ory1Ac*. Hạt của 30 dòng chuyển nạp gen ở thể hệ T1 cấy trên môi trường thanh lọc chứa 2% mannose, sau 12 ngày cây sống và phát triển được chuyển sang chậu sành. Lấy sâu mới nở đã được nhân thả trên nhoch lúa theo một số 1 con/chồi. Ngay khi thả sâu xong chụp mỗi chậu lại bằng lồng nhựa trong 5 ngày để sâu ổn định và tránh côn trùng khác tấn công khi sâu chưa đục vào bẹ lúa. Tất cả các chậu thí nghiệm được đặt trong khay lớn chứa nước vừa đủ cho cây lúa cũng như sâu đục thân cư trú. Giống chuẩn kháng W1263, giống chuẩn nhiễm IR29. Sử dụng phương pháp đánh giá cấp kháng của IRRI và ghi nhận tỷ lệ sâu sống sót và trong lượng sâu.

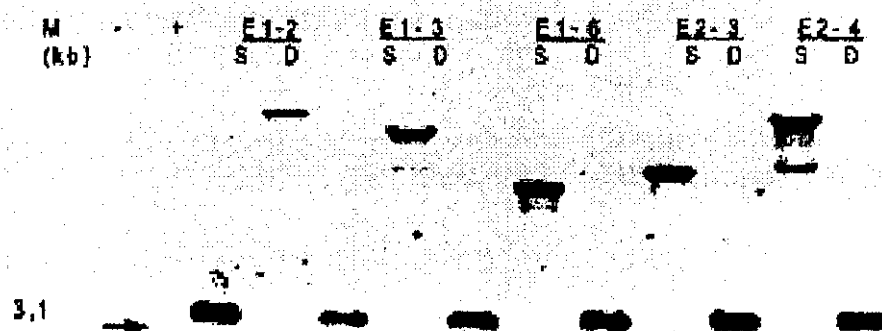
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo các dòng lúa biến đổi gen dùng hệ thống chọn lọc mannose. Hệ thống chọn mannose dựa trên việc sử dụng gen *pmi-* được phân lập từ *Escherichia coli* làm gen chỉ thị chọn lọc. gen này tạo ra enzyme phosphomannose isomerase. Trong môi trường nuôi cấy có thêm mannose, enzyme hexokinase trong tế bào biến đổi

mannose thành mannose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây (không biến đổi gen) không thể sử dụng nên cây không phát triển được. Ngược lại, các tế bào biến đổi gen, enzyme phosphomannose isomerase do gen *pmi* tạo ra chuyển hóa mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây có thể sử dụng nên cây sinh trưởng phát triển. Kết quả nghiên cứu này cho thấy hệ thống chọn lọc mannose rất có hiệu quả. Đối với véc-tơ PUBB-Man, hiệu quả biến đổi gen trên giống IR 64 từ 1,00-2,40% và K105 từ 0,79-3,33%. Đối với véc-tơ PUBC-Man trên giống IR 64 từ 1,80-4,78%, K105 từ 1,81-3,07% và Một Bụi từ 5,50-5,83 % (Bảng 1).

BẢNG 1. Hiệu quả biến đổi gen bằng *A.tumefaciens* LBA 4404

Véc-tơ/Giống	Thí nghiệm	Số mô sẹo tạo phôi được chống (A)	Số mô kháng	Số cây xanh lá sinh	Cây biến đổi gen (Kiểm chống bằng Southern blot+) (B)	Hiệu quả biến đổi gen (EVA)%
PUBB-Man/IR64	1	125	15	6	3	2,40
	2	140	10	5	2	1,42
	3	100	6	3	1	1,00
PUBB-Man/K105	1	120	16	7	3	2,50
	2	150	12	8	5	3,33
	3	146	4	2	1	0,79
PUBC-Man/IR64	1	230	60	25	11	4,78
	2	110	10	5	2	1,80
	3	100	9	4	2	2,00
PUBC-Man/K105	1	130	15	7	2	1,81
	2	130	16	9	4	3,07
	3	146	14	6	3	2,06
PUBC-Man/Một Bụi	1	109	10	7	6	5,50
	2	120	10	8	7	5,83



HÌNH 2. Phân tích Southern blot các dòng T0 của giống Một Bụi. DNA được cắt đoạn bằng KpnI ở một điểm cắt (S) bằng XhoI ở 2 điểm cắt (D). Màng được lai với đoạn gen *ory1Ac* (c) phương pháp đánh dấu DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 3,1 kb của gen *cry1Ac* (c) và một phần vùng khởi động Ubiquitin. -: đối chứng (không biến đổi gen), +: Plasmid DNA

Kết quả phân tích Southern trên các cây biến đổi gen kháng định gen *cry1Ab* hoặc *cry1Ac* đã được gắn vào hệ gen của các giống lúa. Hình 2 xác định sự hiện diện của gen *ory1Ac* ở các dòng biến đổi gen giống lúa Một Bụi và cho thấy gen được gắn vào bộ gen cây với số bản (copy) 1-2 và không có sự tái sắp xếp. Đây là ưu điểm của phương pháp sử dụng *Agrobacterium* trong chuyển nạp gen.

Tính kháng sâu đục thân của các dòng lúa biến đổi gen *cry1Ab* và *ory1Ac*. Kết quả ghi nhận 20 ngày sau khi chủng sâu, dựa trên % chết chết (Bảng 3) cấp hạt sâu đục thân trên 30 dòng lúa biến đổi gen thể hệ T1 và 2 giống chuẩn kháng, chuẩn nhiễm được phân bố như Bảng 2.

NÔNG NGHIỆP - NÔNG THÔN - MÔI TRƯỜNG

Tỷ lệ sâu sống sót và trọng lượng sâu thả sau khi chủng 25 ngày được ghi nhận ở Bảng 3. Kết quả cho thấy có 16 dòng không có sâu sống, 11 dòng có số sâu sống dưới 10%, 5 dòng có tỷ lệ sâu sống từ 10 đến 28%. Giống chuẩn nhiễm có tỷ lệ sâu sống 8,88%, giống chuẩn kháng có tỷ lệ sâu sống 4,87%.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế 2 véc-tơ mang gen chọn lọc *pmi* cho hệ thống chọn lọc bằng mannose và gen kháng sâu *cryIAb* hoặc *cryIAc*. Kỹ thuật chuyển nạp gen sử dụng *Agrobacterium* và hệ thống chọn lọc mannose đã đem lại hiệu quả khá quan trọng, tạo được các dòng lúa mang gen *cryIAb* hoặc *cryIAc* xác định bằng phân tích Southern cho 3 giống lúa M164, IR64 và K105. Trong 30 dòng biến đổi gen thế hệ T1, 13 dòng thể hiện tính kháng sâu đục thân cao (cấp 1). Phương pháp *Agrobacterium* kết hợp với hệ thống chọn lọc mannose có khả năng tạo các dòng biến đổi gen sạch, khắc phục sự lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen đối với môi trường và sức khỏe con người.

Transfer of *cryIAb* and *cryIAc* gene for insect resistance into rice varieties using *Agrobacterium*-mediated method and mannose selection (Summary)

Stem borer is one of the major insect pests on rice causing significant yield loss. Conventional breeding methods have not been effective because of lack of resistant donors from the rice germplasm. Therefore, genetic transformation would offer a solution to transfer resistant genes into rice. In our study, *Agrobacterium*-mediated transformation method and mannose selection system based on using *pmi* gene as the selectable marker were used to transfer the two resistant genes- *cryIAb* or *cryIAc* into three

BẢNG 2.

Cấp	Phân tích	Số dòng	% chồi chết
0	Rất kháng	0	0
1	Kháng	13	1-10
3	Hơi kháng	10	11-20
5	Hơi nhiễm	4	21-30
7	Nhiễm	4 (gồm giống chuẩn kháng)	31-60
9	Rất nhiễm	1 (giống chuẩn nhiễm)	>61

BẢNG 3. Tỷ lệ chồi chết 20 ngày sau khi chủng, tỷ lệ sâu sống sót và trọng lượng sâu 26 ngày sau khi chủng

Ký hiệu	Dòng Gen	% chồi chết*	Số sâu thả (con)	Tỷ lệ sâu sống (%)	Trọng lượng sâu (gram)
29	E2-5-6/cryIAc	1,66 a	36	0	0
1	E2-1-1/cryIAc	2,88 a	34	0	0
16	E2-3-2/cryIAc	4,62 ab	31	6,45	0,03
14	E2-2-9/cryIAc	4,92 ab	24	0	0
5	E2-1-5/cryIAc	5,34 ab	31	0	0
24	E2-4-7/cryIAc	5,34 ab	31	6,43	0,03
3	E2-1-3/cryIAc	5,66 ab	33	0	0
8	E2-2-3/cryIAc	6,82 ab	31	0	0
9	E2-2-4/cryIAc	6,94 ab	30	0	0
2	E2-1-2/cryIAc	7,50 abc	28	0	0
13	E2-2-8/cryIAc	7,50 abc	23	8,69	0,02
26	E2-5-2/cryIAc	9,82 abc	31	3,22	0,02
4	E2-1-4/cryIAc	10,31 abc	32	0	0
18	E2-3-4/cryIAc	11,50 abc	31	0	0
28	E2-5-5/cryIAc	12,15 abc	35	11,42	0,03
25	E2-5-1/cryIAc	12,39 abc	35	8,57	0,04
17	E2-3-3/cryIAc	12,70 a-d	33	0	0
15	E2-3-1/cryIAc	13,03 a-d	26	7,69	0,04
7	E2-2-2/cryIAc	13,06 a-e	35	2,85	0,01
6	E2-2-1/cryIAc	13,38 a-e	33	0	0
27	E2-5-4/cryIAc	14,99 a-e	34	3,88	0,02
10	E2-2-5/cryIAc	16,38 a-f	31	0	0
12	E2-2-7/cryIAc	19,72 a-g	17	0	0
11	E2-3-6/cryIAc	22,08 b-h	32	0	0
19	E2-4-1/cryIAc	25,79 c-l	29	10,34	0,06
23	E2-4-5/cryIAc	30,42 d-l	35	0	0
21	E2-4-3/cryIAc	30,95 e-l	31	9,67	0,04
22	E2-4-4/cryIAc	33,39 f-l	39	13,38	0,02
20	E2-4-2/cryIAc	34,77 g-l	41	14,63	0,10
30	E2-6-1/cryIAc	42,78	32	28,12	0,12
32	WJ263(CK)	37,99 h	41	4,87	0,02
31	IR29(CN)	61,12 j	45	8,88	0,07

CN: Chuẩn nhiễm, CK: Chuẩn kháng, *số theo sâu cùng chữ không khác biệt có ý nghĩa trong phép thử Duncan.

Indica varieties- M164, IR64 and K105. The efficiency in our transformation experiment was quite satisfactory. evaluated. The results of evaluation for resistance to stem borer in the greenhouse showed that out of 30 transgenic T1 lines tested, 13 lines possessed high resistance. This approach in our study is aiming at developing clean transgenic lines.

3B.O.6

TIÊU CHUẨN HOÁ HỆ THỐNG CHỌN LỌC MANNOSE VÀ ỨNG DỤNG HỆ THỐNG NÀY TRONG CHUYỂN NẠP GEN HỮU DỤNG BẰNG *AGROBACTERIUM* Ở LÚA

Trần Thị Cúc Hòa

Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long

Lê Trần Bình

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

Bùi Bá Bổng

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chuyển nạp gen ở cây trồng, hệ thống chọn lọc cây biến đổi gen thông dụng nhất là sử dụng thuốc kháng sinh hoặc thuốc trừ cỏ. Các tế bào đã biến đổi gen có khả năng phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy có chứa chất kháng sinh (thường dùng nhất là hygromycin) hoặc chất trừ cỏ (thường dùng nhất là PPT). Việc sử dụng các hệ thống chọn lọc này gây nhiều lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen đối với môi trường và sức khỏe con người. Nhằm khắc phục nhược điểm này, gần đây một phương pháp chọn lọc mới đã được ứng dụng, đó là hệ thống chọn lọc bằng mannose.

Hệ thống chọn lọc này dựa trên việc sử dụng gen *pmi* được phân lập từ *Escherichia coli* điều khiển tạo ra enzyme phosphomannose isomerase (Miles và Guest 1984) làm gen chỉ thị. Trong môi trường nuôi cấy có thêm mannose, tế bào đổi chứng không mang gen *pmi*, enzyme hexokinase tích tụ trong các tế bào làm biến đổi mannose thành mannose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây không sử dụng nên tế bào không phát triển được. Ngược lại, các tế bào có mang gen *pmi*, enzyme phosphomannose isomerase được tạo ra làm biến đổi mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây có thể sử dụng cho sự sinh trưởng phát triển. Vì vậy chỉ có cây trồng có mang gen *pmi* mới có khả năng phát triển bình thường trong môi trường in vitro có chứa mannose, trong khi các cây không có gen *pmi* không phát triển được. Sự biểu hiện của gen *pmi* có thể được nhận thấy bằng xét nghiệm Chlorophenol red (CR). Trong môi trường có chứa mannose và CR, các tế bào được chuyển nạp gen *pmi* sẽ sử dụng được đường mannose tạo thành fructose-6-phosphate, làm hạ pH và dung dịch CR có màu đỏ sẽ biến thành màu vàng.

Hệ thống chọn lọc bằng mannose đã được áp dụng trong tạo cây biến đổi gen ở cây củ cải đường (Joersbo và ctv. 1998), bắp và lúa mì (Wright và ctv. 2001).

Trong nghiên cứu này, hệ thống chọn lọc bằng mannose được chuẩn hóa và ứng dụng để tạo cây biến đổi gen bằng *Agrobacterium* trên các giống lúa. Điều này có ý nghĩa trong việc phát triển phương pháp tạo ra các dòng lúa biến đổi gen "sạch", khắc phục các mối lo ngại về tính an toàn của cây biến đổi gen hiện nay.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế véc-tơ (vector)

Véc-tơ pManCa (hình 1) được thiết kế bằng cách dùng véc-tơ pCambia 1301 (Cambia, Canberra, Australia) nhưng gen hpt (hygromycin phosphotransferase) trên véc-tơ này được lấy ra và thay vào đó là gen *pmi* (phosphomannose isomerase). Để thực hiện mục tiêu này, gen *pmi* được tách ra từ véc-tơ pCaCar (Hoa và ctv., 2003) bằng enzyme giới hạn cắt đoạn bởi XhoI và gắn vào vị trí tương ứng, dưới sự điều khiển của của đoạn khởi động (promoter) CaMV 35S. Véc-tơ được chuyển vào tế bào của dòng *A. tumefaciens* chủng LBA 4404 (Hoekema và ctv., 1984). Một đơn khuẩn lạc của *Agrobacterium* được ủ qua đêm trong 3 ml môi trường YEB lỏng chứa 50 mg/l kanamycin trên máy lắc (240 rpm) ở 28°C. Một mẫu huyền phù vi khuẩn (250 µl) được chuyển vào 50 µl môi trường mới và ủ trong 18-20 giờ để đạt OD₆₀₀ 0,5-1,0. Vi khuẩn được ly tâm ở 6.000 vòng/phút ở 40°C trong 10 phút. Cặn vi khuẩn được hoà tan trở lại môi trường MS có chứa 100 g/l sucrose, 2 mg/l 2,4-D, pH 5,5 và 200 mM acetosyringone. Nuôi cấy vi khuẩn *Agrobacterium* trong 2-3 giờ ở 28°C (200 rpm) trước khi được dùng để chuyển vào mô cây.

Giống lúa và phương pháp chuyển gen

Vật liệu khởi đầu là mô sẹo từ phôi non

Phôi non của các giống lúa IR64, MTL250 và DS20 được trích và nuôi cấy trong môi trường tạo mô sẹo. Chọn các mô sẹo có khả năng sinh phôi để chủng với vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng LBA 4404. Phương pháp chuyển gen được thực hiện theo Hoa và Bong (2003). Chọn lọc được tiến hành cách nhau mỗi hai tuần trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có chứa 30 g/l và 25 g/l mannose (D(+)-mannose 99+%, Heros Organics, Geel, Belgium) ở vòng chọn lọc thứ nhất, 15 g/l sucrose và 25 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ hai và 5 g/l sucrose cộng với 35 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba. Phương pháp tái sinh cây và cho ra rễ theo qui trình của Aldermita và Hodges (1996) với vài thay đổi. Các cây kháng mannose được kiểm tra lại bằng xét nghiệm Chlorophenol red chuyển trắng ra đất.

Vật liệu khởi đầu là huyền phù tế bào

Hạt lúa đã bóc vỏ của giống Một Bụi và MTL 250 sau khi được khử trùng bằng 70% (vol/vol) được cấy trong môi trường MSCI (Murashige và Skoog, 1962) trong 2 - 3 tuần. Huyền phù tế bào được tạo theo miêu tả của Hoa và Bong (2003) và được chủng với 20-25 ml của dung dịch vi khuẩn *Agrobacterium*. Sau 30 phút, dung dịch vi khuẩn được lấy đi và cụm tế bào được đặt trên giấy lọc vô trùng (9cm) và được chuyển sang đĩa petri chứa môi trường MSCo đặc (Aldermita và Hodges 1996) chứa 200 mM acetosyringone và cùng nuôi cấy ở 25°C trong 3-4 ngày. Cụm tế bào đã chủng được chuyển vào môi trường MS lỏng chứa 250 mg/l cefotaxim và được nuôi cấy trong 3 ngày trên máy lắc ở 150 rpm. Vật liệu được chuyển sang cùng một môi trường mới và nuôi cấy trong 3-4 ngày. Chọn lọc được thực hiện mỗi 2 tuần trên môi trường MS lỏng chứa 30 g/l sucrose và 25 g/l mannose [D(+)-mannose 99%, Heros Organics, Geel, Belgium] với 250 mg/l cefotaxim cho vòng thứ nhất, 15 g/l sucrose và 25 g/l mannose cho vòng chọn lọc thứ hai, cấy chuyển được thực hiện cách mỗi 3 ngày. Sau 4 tuần- vòng chọn lọc thứ ba, các cụm tế bào biến đổi gen được chuyển sang môi trường MS đặc có chứa 35 g/l mannose và 5 g/l sucrose để chọn lọc các cụm tế bào kháng mannose. Phương pháp tái sinh cây và trồng cây ra đất như đã trình bày ở trên.

Xét nghiệm Chlorophenol red (CR)

Phân tích chlorophenol red (CR) (Kramer và ctv. 1993) được dùng để nhận diện kiểu hình cây trồng có chứa gen *pmi* được áp dụng với vào thay đổi nhỏ. Rễ cây được cắt ra đoạn dài 5-10 mm từ cây tái sinh trong môi trường nuôi cấy vô trùng. Các đoạn rễ này được cho ngập trong các giếng chứa 500 μ l môi trường MS ở pH 5.8 trong 30 phút đến 1 giờ. Sau đó môi trường MS được hút ra khỏi giếng và các đoạn rễ được nhúng trong 500 μ l môi trường có chứa 20g l⁻¹ mannose, 500mg l⁻¹ chlorophenol red, pH 6.0, ở pH này CR cho màu đỏ đậm. Đĩa được khấn lại và ủ ở 29°C trong vòng 2-3 ngày.

Trích DNA và phân tích Southern

DNA được trích từ lá đông lạnh theo phương pháp của McCouch và ctv. (1988). Mười micrograms DNA được cắt đoạn với XhoI (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen *pmi* và cắt đoạn với BamHI (một điểm cắt) để xác định số copy. DNA cắt đoạn được chạy điện di qua 8 g/l agarose gel trước khi chuyển bằng mao dẫn và cố định trên màng nylon (Hybond-N+, Amersham). Gen *pmi* được đánh dấu bằng DIG (Boehringer, Rotkreuz, Switzerl) được dùng làm vật dò (probe). Lai, rửa và phát hiện gen được thực hiện theo phương pháp của Wiinn và ctv. (1996).

Phân tích sự phân ly của gen được chuyển nạp

Hạt tự thụ của các cây biến đổi gen (thế hệ T1) được cấy trong môi trường MS có thêm 5 g/l sucrose và 20g/l mannose. Cây kháng được đánh giá sau 2 tuần nuôi cấy và được chuyển vào nhà lưới và lấy mẫu để phân tích Southern.

Thiết kế véc-tơ chứa gen kháng sâu CryIA(b) và CryIA(c) với gen chọn lọc là *pmi*

Để tạo ra các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu bằng hệ thống chọn lọc mannose, hai véc-tơ mới đã được thiết kế:

Véc-tơ pUBB-Man: mang gen *cryIA(b)* điều khiển bởi đoạn khởi động ubiquin và gen *pmi* điều khiển bởi CaMV 35S. Véc-tơ được chuyển vào *A. tumefaciens* dòng LBA 4404.

Véc-tơ pUBC-Man: mang gen *CryIA(c)* điều khiển bởi đoạn khởi động ubiquin và gen *pmi* điều khiển bởi CaMV 35S. Véc-tơ được chuyển vào *A. tumefaciens* dòng LBA 4404.

Hai véc-tơ trên được chuyển nạp vào hai giống lúa Taipei 309 và Một Bụi theo phương pháp nêu trên.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

¹ Các giống lúa được dùng để chuyển nạp gen chỉ thị *pmi* bằng phương pháp sử dụng *Agrobacterium* gồm Một Bụi, IR64, MTL 250 và DS20, đây là các giống lúa thuộc nhóm indica, phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long.

Với vật liệu là mô sẹo từ phôi non, hiệu quả biến đổi gen trên các giống lúa indica từ 2,43-8,33% (Bảng 1). Aldermita và Hodges (1996) thực hiện chuyển nạp gen trên các giống indica bằng *Agrobacterium* và chọn lọc bằng hygromycin, thu nhận hiệu quả biến đổi gen từ 1-4%, thấp hơn hiệu quả đạt được ở nghiên cứu này.

Bảng 1. Hiệu quả biến đổi gen bằng *A. tumefaciens* LBA 4404 (pManCa)

Giống	Thí nghiệm	Số mô sẹo tạo phôi được chủng (A)	Số mô kháng	Số cây Xanh tái sinh	Cây biến đổi gen (kiểm chứng bằng Southern blot+)(B)	Hiệu quả biến đổi gen (B/A)%
IR64	1	120	20	15	10	8,33
	2	110	10	8	5	4,54
	3	120	9	6	4	3,33
	4	130	21	14	9	6,92
MTL250	1	100	20	16	5	5,00
	2	120	25	22	7	5,83
	3	140	22	16	4	2,85
DS20	1	110	15	10	3	2,72
	2	120	18	12	5	4,16
	3	130	14	6	3	2,30

Với vật liệu khởi đầu là huyền phù tế bào, việc chọn lọc đã được tiến hành trên môi trường chứa mannose trong 6-7 tuần. Tổng cộng 6 thí nghiệm đã được tiến hành (3 trên giống Một Bụi và 3 trên giống MTL 250). Kết quả tổng hợp được trình bày ở Bảng 2. Từ thể tích 6 ml của các cụm tế bào cho mỗi giống, đã thu được 12 cây biến đổi gen độc lập từ giống Một Bụi và 15 cây biến đổi gen độc lập từ giống MTL250. Các cây này được kiểm chứng bằng phân tích Southern.

Nghiên cứu này cũng đã xác định ngưỡng nồng độ mannose để chọn lọc có hiệu quả. Nồng độ được gia tăng qua mỗi vòng chọn lọc, vòng chọn lọc thứ nhất và thứ hai sử dụng nồng độ là 25 g/l, tăng lên vào vòng chọn lọc thứ ba là 35 g/l. Ngưỡng nồng độ mannose dùng trong chọn lọc lúa biến đổi gen cao hơn ở lúa mì, bắp (Wright và ctv., 2001) và củ cải đường (Joersbo và ctv., 1998).

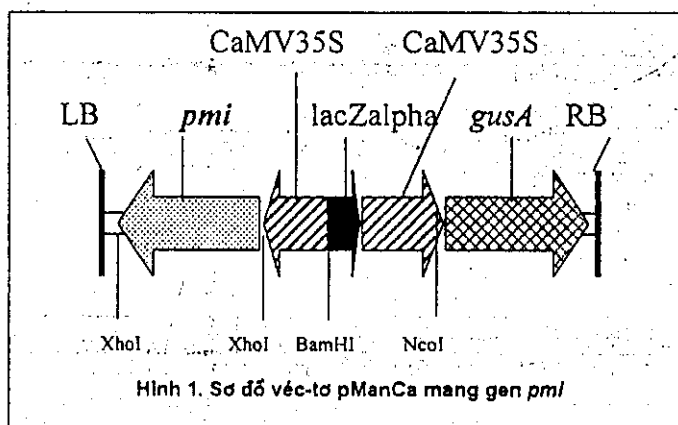
Khác với nồng độ mannose, nồng độ sucrose được cho giảm dần qua mỗi vòng chọn lọc để cân bằng áp lực thẩm thấu của môi trường và ngăn cản sự phát triển của các tế bào không biến đổi gen. Tuy nhiên ở nghiên cứu này, với nồng độ 5 g/l ở vòng chọn lọc thứ ba dẫn đến tỷ lệ sống sót cao. Wright và ctv. (2001) cũng thông báo tỷ lệ sống sót cao khi dùng nồng độ sucrose thấp ở vòng chọn lọc chót.

Hai tuần trong môi trường tạo rễ, sự hoạt động của phosphomannose isomerase ở các cây có khả năng đã biến đổi gen được xét nghiệm bằng Chlorophenol red (CR). Trong xét nghiệm này, giống chứa các mô biến đổi gen làm biến đổi màu của môi trường từ đỏ đậm sang vàng. Sau xét nghiệm CR, các dòng biến đổi gen được kiểm chứng bằng phân tích Southern. Sự hiện diện của gen *pmi* được ghi nhận ở các dòng làm thay đổi màu từ đỏ sang vàng trong xét nghiệm CR, không có sự hiện diện của gen *pmi* ở dòng không có biến đổi màu.

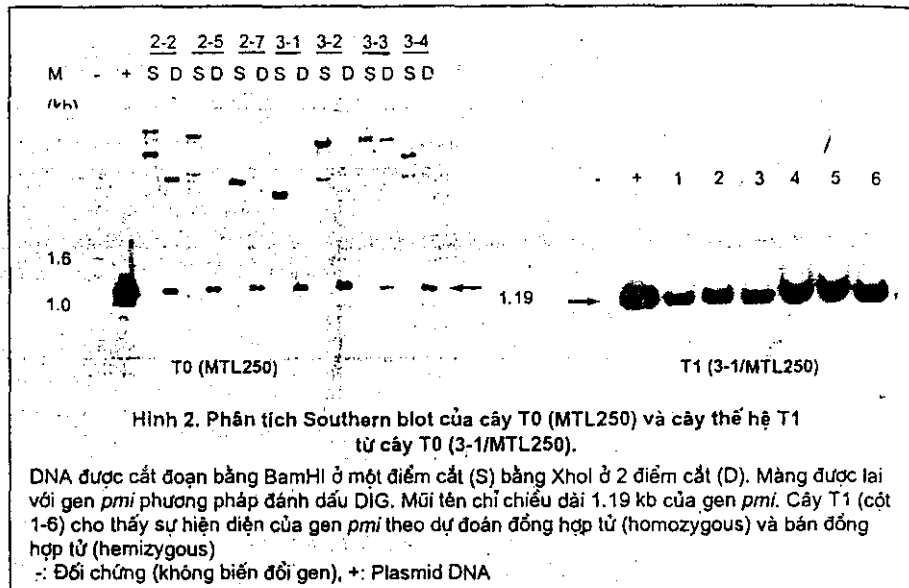
Sự phân ly các dòng T1 trên môi trường thanh lọc có chứa mannose theo tỷ lệ 3 vàng: 1 đỏ theo phân ly Mendel. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy chọn lọc bằng mannose hầu như không xảy ra sống sót và cây biến đổi màu trong xét nghiệm CR được kiểm định có mang gen *pmi* bằng phân tích Southern. Vì vậy phương pháp chọn lọc mannose là phương pháp nhanh và tin cậy trong chọn lọc các cây biến đổi gen. Thời gian đánh giá có thể được thực 75 ngày sau khi chuyển nạp.

Bảng 2. Hiệu quả biến đổi gen ở phương pháp chủng *Agrobacterium* trên huyền phù tế bào

Giống	Thể tích tế bào đậm đặc (ml)	Số các cụm tế bào kháng	Số cây biến đổi gen tái sinh (kiểm chứng bằng Southern blot +)
Một Bụi	6	16	12
MTL 250	6	22	15
Tổng cộng	12	38	27

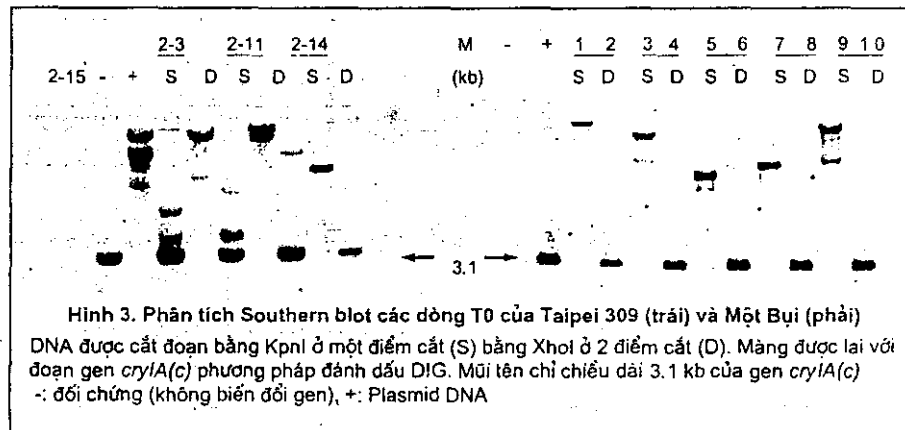


Nghiên cứu này cũng cho thấy lợi điểm của phương pháp biến đổi gen bằng



Agrobacterium. Gen chuyển nạp được gắn vào bộ gen cây lúa theo phương thức đơn giản và tái tổ hợp gen chuyển nạp không xảy ra (Hình 2). Gen *pmi* được truyền sang thế hệ T1 biểu hiện đồng hợp tử và bán đồng hợp tử như dự đoán (Hình 3).

Ứng dụng chọn lọc mannose trong chuyển nạp các gen hữu ích vào lúa đã được thực hiện. Véc tơ mang gen kháng sâu *cryIA(b)* hoặc *cryIA(c)* và gen chỉ thị *pmi* cho phép áp dụng hệ thống chọn lọc mannose đã



được thiết kế và chuyển nạp vào hai giống lúa là Taipei 309 và Một Bụi. Kết quả đã thu được các dòng T0 mang gen *cryIA(c)* được kiểm định bằng phân tích Southern (hình 3). Nghiên cứu đang được tiếp tục.

Để kết luận, nghiên cứu này đã xác định qui trình chọn lọc sử dụng mannose trong phương pháp biến đổi gen ở lúa bằng *Agrobacterium*. Qui trình này đem lại hiệu quả cao trong chuyển nạp gen ở cây lúa, cả nhóm indica. Việc sử dụng mannose thay thế cho chất kháng sinh, chất kháng thuốc trừ cỏ được đánh giá như là một tiến bộ quan trọng trong tạo ra các dòng biến đổi gen "sạch", thân thiện với môi trường.

Các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu đang được tạo ra bằng ứng dụng hệ thống chọn lọc này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aldermira RR, Hodges TK. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica indica rice varieties. *Planta*. 199: 612-617.
2. Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Peterson SG, Brunstedt J and Okkels FT. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4: 111-117
3. Kramer C, Dimaio J, Carswell GK, Shillito RD. 1993. Selection of transformed protoplast-derived *Zea mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red. *Planta* 190: 454-458.

4. Hoa TTC and Bong BB 2003: *Efficient Agrobacterium-mediated transformation of indica (Oryza sativa L.) using manose selection system*. Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development: 1+2 : 60-63.
5. Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I, Beyer P. 2003. *Golden Indica Japonica Rice Lines Amenable to Deregulation*. Plant Physiol. (accepted)
6. Hoekema A, Roelvink PW, Hooykaas PJJ and Schilperoort RA. 1984. *Delivery of T-DNA from the Agrobacterium tumefaciens chromosome into plant cells*. EMBO J. 3: 2485-2490.
7. McCouch SR, Kochehert G, Yu ZH, Wanh ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD. 1988. *Molecular mapping of rice chromosomes*. Theor Appl Genet 78: 815-829.
8. Miles JS and Guest JR. 1984. *Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene of Escherichia coli*. Gene 32: 41-48.
9. Murashige T, Skoog F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiol Plant 18: 473-497.
10. Winn J, Klott A, Burhardt PK, Ghosh Biswas GC, Launis K, Iglesias VA, potrykus I. 1996. *Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic cryIA(b) gene from Bacillus thuringiensis provides effective pest control*. Bio/Technology 14: 171-176.
11. Wright W, Dawson J, Dunder E, Sultie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L. 2001. *Efficient biolistic transformation of maize (Zea mays L.) and wheat (Triticum aestivum L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker*. Plant Cell Rep. 20: 429-436.

SUMMARY

STANDARDIZATION OF MANNOSE SELECTION SYSTEM AND APPLICATION FOR TRANSFORMATION OF USEFUL GENES INTO RICE BY AGROBACTERIUM METHOD

Tran Thi Cuc Hoa
Cuu Long Delta Rice Research Institute,
Le Tran Binh
Institute of Biotechnology
Bui Ba Bong
Ministry of Agriculture and Rural Development

The use of antibiotics or herbicides as selective agents in plant transformation have caused public concerns on the safety of genetic modified plants. To overcome this problem, alternative novel selection systems have been developed. We reported in this paper the standardization of mannose selection system for indica cultivars grown in Vietnam based on using *pmi* gene encoding for phosphomannose isomerase as the selectable marker gene. Putative transgenic plants could be selected in the medium containing concentrations of 25-35 g/l mannose. A chlorophenol red (CR) assay was used and proved as a rapid and sensitive method for early identification of transgenic events expressing the *pmi* gene. Southern blot analysis confirmed that mannose selection system was highly efficient. This selection system are being applied in transforming rice varieties for insect resistance aiming at developing "clean" transgenic lines.

- Esterase isozyme of the termite species and silkworm varieties are polymorphic.
- Esterase isozyme of *O. yunnanensis* consisted 3 loci and Xuanmai population showed higher degree of polymorphism than Cucphuong termite population.
- Esterase isozyme of Xuanmai *M. annandalei* showed 4 loci and in esterase of Cucphuong termite 6 loci were investigated.
- * And esterase isozyme system of five silkworm varieties was analyzed, the result showed that:
 - Esterase isozyme of A₁, 810, L₁ A silkworm varieties genetically is not different. DSK silkworm is not polymorphic.

Người thẩm định nội dung khoa học: TS. Nguyễn Quốc Khang.

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TÁI SINH CÂY BÔNG (*GOSSYPIMUM HIRSUTUM*) BẰNG CÁCH TẠO ĐA CHỐI

Trương Thu Thủy, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Huệ, Lê Trần Bình
Viện Công nghệ Sinh học (IBT)

Lê Quang Quyền
Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây Có Sợi (RICFC)

1. GIỚI THIỆU

Cây bông (*Gossypium hirsutum*, L.) là nguồn cung cấp sợi may mặc quan trọng. Song năm 2000, Việt Nam mới chỉ sản xuất được 8 ngàn tấn, đáp ứng được 10% nhu cầu. Theo chương trình phát triển ngành dệt may, Việt Nam đến năm 2005 phải sản xuất 150.000 tấn sợi các loại và đến năm 2010 chỉ tiêu đó là 300.000 tấn [7, 9]. Nguyên nhân làm sản lượng thấp chủ yếu là bông bị sâu bệnh và hạn hán. Vì thế một trong những chiến lược để tăng sản lượng bông là tạo ra những giống bông có khả năng kháng sâu và chịu hạn. Chuyển gen là một phương pháp để tạo ra những giống bông như vậy.

Hai phương pháp chuyển gen đang được sử dụng nhiều ở thực vật nói chung và cây bông nói riêng là súng bắn gen và *Agrobacterium*, song phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium* là có hiệu quả nhất.

Tuy nhiên để chuyển được gen bằng súng bắn gen/*Agrobacterium* thì trước tiên cần phải thiết lập và tối ưu cho được hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây *in vitro*. Khả năng nuôi cấy và tái sinh cây tùy thuộc vào các kiểu gen của từng loại đối

tượng cây trồng. Cho đến nay, việc tái sinh đối với cây bông còn rất hạn chế và mới chỉ thành công ở một vài giống như Coker, Deltapine 15 và Jimian [2, 3, 10, 11, 12].

Như vậy, với mục tiêu tái sinh được cây và chuyển gen có định hướng như kháng sâu bệnh và chịu hạn trực tiếp vào những giống có năng suất cao, chất lượng sợi tốt và đang trồng phổ biến, một phương pháp tái sinh hiệu quả và không phụ thuộc vào nguồn gốc di truyền là rất cần thiết. Đó là phương pháp tái sinh thông qua tạo đa chồi từ phôi mà trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được một quy trình áp dụng cho giống bông 254, một giống có tuổi đời trung bình, phẩm chất tốt và thường được dùng làm bố mẹ trong các phép lai chọn giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu tái sinh cây

Giống bông 254 được Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây Có Sợi cung cấp. Sau khi đã bóc vỏ cứng, hạt được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen

60% (Hoá chất Việt Trì) trong 20 phút và rửa 5 lần bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng thấm khô hạt bằng giấy lọc khử trùng. Tách bỏ lá mầm và thu lấy phôi bao gồm cả đỉnh rễ và đỉnh chồi (hình 1A).

2.2. Cảm ứng đa chồi và tái sinh cây

Phôi được đặt lên các môi trường cảm ứng tạo đa chồi C1-C20 của các tổ hợp hoặc môn khác nhau. Sau 10 ngày, đỉnh chồi của phôi được cắt với độ dài trung bình 2 mm và cấy lên các môi

trường tạo đa chồi S1-S5. Thành phần các môi trường như trong bảng 1. Đánh giá khả năng tạo đa chồi sau 5 tuần.

Tách chồi đơn từ các cụm chồi và cấy chuyển lên các môi trường kéo dài chồi E0-E2. Khi chồi cao khoảng 2-4 cm thì kích thích tạo rễ trên các môi trường R1-R2.

2.3. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các tổ hợp môi trường nuôi cấy được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Thành phần các môi trường tái sinh cây và tạo đa chồi

Thành phần cơ bản chung của các môi trường		Các muối môi trường MS ^a cơ bản 30g/L saccharose 9g/L thạch 1g/L than hoạt tính cho môi trường E và R			
Thành phần chất điều khiển sinh trưởng trong các môi trường		2,4-D ^b (mg/L)	Kin ^c (mg/L)	BAP ^d (mg/L)	NAA ^e (mg/L)
Môi trường	C0	-	-	-	-
cảm ứng tạo	C1	0,05	-	0,40	0,10
đa chồi	C2	0,10	-	0,40	0,10
	C3	0,20	-	0,40	0,10
	C4	0,40	-	0,40	0,10
	C5	0,05	-	0,80	0,10
	C6	0,10	-	0,80	0,10
	C7	0,20	-	0,80	0,10
	C8	0,40	-	0,80	0,10
	C9	0,05	-	1,00	0,10
	C10	0,10	-	1,00	0,10
	C11	0,20	-	1,00	0,10
	C12	0,40	-	1,00	0,10
	C13	0,05	-	1,50	0,10
	C14	0,10	-	1,50	0,10
	C15	0,20	-	1,50	0,10
	C16	0,40	-	1,50	0,10
	C17	0,05	-	2,00	0,10
	C18	0,10	-	2,00	0,10
	C19	0,20	-	2,00	0,10
	C20	0,40	-	2,00	0,10
Môi trường	S1	-	0,50	0,50	0,10
tạo đa chồi	S2	-	1,00	1,00	0,10
	S3	-	2,00	2,00	0,10
	S4	-	2,50	2,50	0,10
	S5	-	1,00	2,00	0,10
Môi trường	E0	-	-	-	-
kéo dài chồi	E1	-	0,10	0,10	-
	E2	-	0,50	0,50	-
Môi trường	R1	-	-	-	0,20
tạo rễ	R2	-	-	-	0,50

^a Murashige và Skoog

^b 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; ^c Kinetin; ^d 6-Benzyl amino purin; ^e 1-Naphthyl acetic acid.

Môi nuôi cấy được đặt trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và chế độ chiếu sáng 8h/16h với cường độ ánh sáng 2000 lux.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cảm ứng tạo đa chồi

Trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng CO, phôi nhanh chóng vươn dài thành cây con và phát triển lá. Trong khi đó, trên tất cả các môi trường cảm ứng đa chồi (C1-C20), 100% phôi không phát triển thành cây hoàn chỉnh mà phình to, phát sinh mô sẹo màu trắng. Như vậy, sự kết hợp 2,4-D, BAP và NAA đã có tác dụng làm kim hàm quả trình biệt hoá, tạo ra nhiều tế bào liên tục phân chia. Trong thí nghiệm của chúng tôi thì môi trường C16 cho mức độ cảm ứng vừa phải và đồng đều nhất. Sau 10 ngày trên môi trường C16, chiều cao trung bình của phôi là 1,5 cm, dao động từ 1cm đến 4cm. Đỉnh chồi được cắt làm nguyên liệu tạo đa chồi.

3.2. Sự hình thành cụm chồi

Các đỉnh chồi của phôi (hình 1B) được đặt lên các môi trường kích thích tạo đa chồi S1-S5 chứa các tổ hợp khác nhau của Kinetin, BAP và NAA. Sau 5 tuần, chồi mới chỉ xuất hiện ở dạng 1 chồi (đơn chồi), hoặc dạng 2-3 chồi (cụm 2-3 chồi).

Từ bảng 2, một số mẫu vật ngả màu nâu, ít khả năng sống sót có thể do đỉnh chồi cổ kích thước rất nhỏ và được cấy trên môi trường với mật độ cao, nên mất cảm đối với thao tác nuôi cấy và các hợp chất phenol do chính mẫu vật tiết ra. Tỷ lệ sống sót của mẫu vật sẽ tăng lên khi kỹ thuật nuôi cấy được tối ưu hoá. Môi trường tạo đa chồi tối phải cho tỷ lệ chết thấp và tỷ lệ tạo cụm chồi cao. Môi trường S1, S2 và S5 cho tỷ lệ chết gần tương đương nhau (20, 28 và 29%), nhưng môi trường S2 và S5 cho tỷ lệ tạo cụm 2-3 chồi cao hơn hẳn (46, 47% so với 33%).

Bảng 2: Sự hình thành chồi sau 5 tuần nuôi cấy

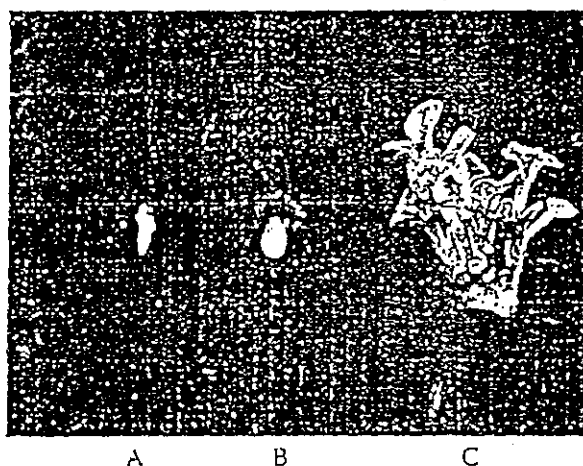
Môi trường tạo đa chồi	Tổng số mẫu vật	Mẫu vật không hoặc chưa tạo chồi		Mẫu vật tạo đơn chồi		Mẫu vật tạo cụm 2- 3 chồi	
		Số lượng	Tỷ lệ(%)	Số lượng	Tỷ lệ(%)	Số lượng	Tỷ lệ(%)
S1	46	9	20	22	48	15	33
S2	47	13	28	12	26	22	47
S3	48	26	54	11	23	11	23
S4	44	18	41	19	43	7	16
S5	48	14	29	12	25	22	46

Sau giai đoạn 5 tuần, các đỉnh chồi đã hình thành 0-3 chồi, đều được cấy chuyển lên chính môi trường tạo đa chồi ban đầu là S2-S4 (bỏ qua môi trường S1), với mục đích tiếp tục thu được cụm chồi. Ba tuần sau, các cụm chồi trung bình 4,5 chồi/cụm và nhiều nhất là 10 chồi/cụm đã hình thành (bảng 3). Như vậy, sau 5 tuần trên môi trường tạo đa chồi thì mới chỉ thu được 0-3 chồi từ mỗi mẫu vật, còn sau 8 tuần với mỗi lần thay mới môi trường đã thu được các cụm chồi

có hệ số chồi cao hơn (hình 1C). Có những mẫu vật không có chồi nào trước khi được cấy chuyển nhưng lại tạo cụm chồi sau khi cấy chuyển. Hầu hết các môi trường S cho tỷ lệ tạo đa chồi trên tổng số mẫu vật cấy chuyển cao, từ 78%-93%, trong đó cao nhất là S5 (93%). Kết hợp kết quả bảng 2 và 3, S5 được chọn là môi trường tối ưu cho quy trình tạo đa chồi áp dụng cho biến nạp gen sau này.

Bảng 3: Sự hình thành cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy

Môi trường	Số mẫu vật cây chuyển	Số cụm chồi > 3 chồi	Tỉ lệ tạo cụm chồi trên tổng số cây chuyển	Số chồi trung bình
S2	36	30	83%	4
S3	45	35	78%	4
S4	40	33	83%	5
S5	42	39	93%	5



Hình 1: Quá trình tạo đa chồi từ phôi:

A: Phôi B: Đỉnh chồi C: Cụm chồi hình thành sau khi cấy chuyển

3.3. Sự phát triển chiều cao của chồi

Kết quả kéo dài chồi được thể hiện trong bảng

4. Các chồi kích thước từ 1 cm trở lên được coi

là có cảm ứng kéo dài. Một số chồi hình thành rõ ngay trên những môi trường này.

Bảng 4: Kết quả kéo dài chồi

Môi trường	Số chồi được kích thích kéo dài	Số chồi 1 cm	Số chồi 2 cm	Số chồi ≥ 3 cm	Tỉ lệ chồi kéo dài
E0	33	2	2	6	30%
E1	39	2	4	2	21%
E2	44	2	3	1	14%

Như vậy là các môi trường không có hoặc môn hoặc có nồng độ hoặc môn Kinetin và BAP thấp (như bảng 1) đã có tác dụng kéo dài chồi. Môi trường E0 cho tỉ lệ kéo dài chồi cao nhất là 30%, chứng tỏ rằng, hàm lượng auxin và cytokinin nội sinh tạo ra trong quá trình hình thành và phát triển của chồi là rất lớn.

3.4. Sự hình thành rễ

Quan sát sự hình thành rễ trên môi trường MS bổ sung NAA ở nồng độ 0,2 và 0,5 mg/L cho thấy sự hình thành rễ diễn ra khá dễ dàng đối với chồi bóng trên cả hai môi trường tạo rễ (bảng 4). Môi trường R1 với hàm lượng 0,2mg/L NAA và 1g/L than hoạt tính cho sự tạo rễ tốt nhất là 100%.

Bảng 5: Sự hình thành rễ

Môi trường tạo rễ	Số chồi được kích thích tạo rễ	Số chồi tạo rễ	Tỉ lệ tạo rễ
R1	27	27	100%
R2	30	21	70%

3.5. Quy trình tái sinh cây bông bằng tạo đa chồi

Từ những kết quả nhận được trên đây chúng tôi xây dựng quy trình tái sinh cây bông bằng phương pháp tạo đa chồi đối với bông giống 254 như sau: Phôi được tách từ hạt và đặt trên môi trường MS có 0,4mg/L 2,4-D, 1,5mg/L BAP và 0,1mg/L NAA trong 10 ngày. Sau đó, cắt và nuôi cấy dinh chồi kích thước 2 mm trên môi trường tạo đa chồi có 1mg/L Kinetin, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA trong thời gian 8 tuần với một lần cấy chuyển, thu được các cụm chồi. Tiếp theo, môi trường không có hoặc môn sinh trưởng được dùng để chồi phát triển chiều cao. Cuối cùng, tạo rễ trên môi trường có 0,2 mg/L NAA.

Trên đối tượng bông vải, phương pháp tái sinh cây từ phôi soma còn rất hạn chế trên thế giới [5, 10], và chủ yếu mới chỉ thành công khi nuôi cấy tế bào huyền phù với nhiều lần thay mới môi trường [3]. Đây là khó khăn cho việc chuyển gen thành công ở cây bông. Mặt khác những giống đã được công bố là tái sinh được như Coker 312, Coker 210... là những giống hầu như không được sản xuất ở Việt Nam. Vì thế việc xây dựng một quy trình tái sinh cây cho những giống bông Việt Nam là yêu cầu thực tiễn. Xây dựng quy trình tái sinh cây thông qua phương pháp tạo đa chồi đối với cây bông có thể khắc phục được những khó khăn trên [6].

Agrawal và cộng sự năm 1997 công bố đã thành công trong việc tạo đa chồi từ mẫu lá mầm cây con 35 ngày tuổi với hệ số 4-5 chồi/mẫu vạt [1]. Năm 1998, Hemphill và cộng sự công bố tái sinh được cây bông bằng cách tạo chồi, cũng dưới tác động của BAP từ những mô phân sinh có sẵn của cây con 28 ngày tuổi được tạo ra trong ống nghiệm bằng cách duy trì nuôi cấy các mô phân sinh [7]. Ngoài dinh chồi, các mẫu vạt còn là các mẫu lá mầm và mẫu lá thật. Phương pháp này lấy việc sử dụng nhiều nguồn mẫu vật có mô phân sinh sẵn có của cây con để tăng tỉ lệ tái sinh nên tỉ lệ biến nạp cũng đã được một phần cải thiện. Quy trình tạo đa chồi từ phôi do

chúng tôi thiết lập không những đã có hệ số tạo chồi tương tự, mà còn bỏ qua được giai đoạn tạo cây con 35 ngày tuổi hay quá trình nuôi cấy liên tục mô phân sinh *in vitro* trong 28 ngày để tạo nguồn mẫu vật, và do đó rút ngắn được thời gian tái sinh cây.

Mặc dù cần khẳng định thêm sự trọn vẹn của quy trình tái sinh cây bằng cách trồng cây trên đất và theo dõi sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản của cây tái sinh, kết quả của chúng tôi trên đây đã đưa ra một triển vọng là tái sinh được giống bông 254 với tỉ lệ khá cao. Ngoài ra, tái sinh qua tạo đa chồi cũng có thể áp dụng cho nhiều giống bông khác.

KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu phát triển được quy trình tái sinh *in vitro* ở cây bông bằng phương pháp tạo đa chồi từ phôi giống bông vải 254. Phôi bông được nuôi cấy trên môi trường MS có 0,4mg/L 2,4-D, 1,5mg/L BAP và 0,1mg/L NAA, sau đó dinh chồi được cấy chuyển lên môi trường có 1mg/L Kinetin, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA để tạo cụm chồi. Chồi phát triển kéo dài trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng. Sau cùng một lượng rất nhỏ NAA được dùng để kích thích tạo rễ. Kết quả này khẳng định một triển vọng cho việc khắc phục những khó khăn của việc tái sinh theo con đường tạo phôi soma ở loại cây khó nuôi cấy này.

Hệ số chồi và tỉ lệ tái sinh khá cao chứng tỏ tính khả thi của công tác chuyển nạp gen vào cây bông. Quy trình đang áp dụng để biến nạp gen thông qua *Agrobacterium*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Agrawal D.C. 1997. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 16; 647-652.
2. Feng R., Zhang B.H., Zhang W., and Wang Q. 1998. Genotype analysis in cotton tissue

- culture and plant regeneration. Agricultural Biotechnology: Laboratory, Field and Market. Proceedings of the 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology. Australia. 161-163.
3. *Finer J.J.* 1988. Plant regeneration from somatic embryonic suspension cultures of cotton. *Plant Cell Reports* 10: 346-350.
4. *Finer J.J.* 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 8: 586-589.
5. *Firoozabady E.* 1986. Isolation, culture and cell division in cotyledon protoplast of cotton (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*). *Plant Cell Reports* 5: 127-131.
6. *Gould J., Banister S., Hasegawa O., Fahima M., and Smith R.H.* 1991. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot apex tissues for transformation. *Plant Cell Reports* 10:12-16.
7. *Hemphill J.K., Maier C.G.A and Chapman K.D.* 1998. Rapid *in-vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 17: 273-278.
8. *Nguyễn Hữu Bình.* Kế hoạch phát triển bông đến 2005-2010 và những giải pháp chủ yếu. 2001. Công ty Bông Việt Nam. Tổng Công ty Dệt-May Việt Nam. 2.
9. Quyết định số 55/2001/QĐ-TTg ngày 23/4/2001 của Thủ tướng Chính phủ.
10. *Rajasekaran K.* 1996. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 15: 859-864.
11. *Trolinder, N.* 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 6:231-234.
12. *Umbeck P.* 1985. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Biotechnology* 5: 263-266.

SUMMARY

Developing a plant regeneration system via in vitro induction of multiple shoots in cotton (Gossypium hirsutum L.)

To facilitate the transformation of some important genes such as insect-resistance and drought-tolerance encoding genes into Vietnam cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars, a study on developing a plant regeneration system in cotton was conducted. As cotton regeneration via somatic embryogenesis has been proved very difficult and strictly genotype dependent, our research focused on the regeneration by multishoot formation from seeds of high yield cultivar 254.

Seeds were sterilized through treatment with 70% ethanol for one minute and with 60% Javell solution for 20 minutes. It was necessary to separate cotyledons from the seed scores to obtain embryos as explants for *in vitro* regeneration. A wide range of hormonal combinations were screened for optimal processes: multishoot induction, multishoot formation, shoot elongation and root formation.

Based on the media screening results, a procedure for multiple shoot-mediated plant regeneration in cotton has been established. Having been isolated from sterile seeds, embryos were cultured for 10 days on multishoot induction medium consisting of 0.4 mg/L 2,4-D, 1.5 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA. This plant regulator combination played an important role in slowing down the differentiation process of the embryos. Then the apical meristem regions of 2 mm long were dissected and passed onto multishoot formation medium with 1 mg/L Kinetin, 2 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA, which drove the continuously dividing cells derived from the former process towards the formation of shoots. After 8 weeks with one subculture, a cluster of average 4.5 shoots and maximum 10 shoots arose from each shoot apex of an original zygotic embryo. Subsequently, individual shoots were separated from the shoot clusters and were induced to elongate on the medium without phytohormones. Afterwards, rooting could be easily obtained by adding 0.2mg/L NAA. All the media contain major and minor Murashige and Skoog salts as basal components. Transferring the *in vitro* rooted plantlets into soil will

1.P.58

XÂY DỰNG THƯ VIỆN GEN TỪ CHỦNG *BACILLUS THURINGIENSIS* AB51 CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG BỌ HÀ KHOAI LANG

Phạm Thị Trà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Lê Trần Bình
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Nguyễn Văn Mùi
Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các loại sâu bệnh gây hại đến cây khoai lang thì bọ hà (*Cylas formicarius*) được xem là loại sâu hại nguy hiểm nhất. Bọ hà thường xuất hiện để phá hại khi cây khoai lang bắt đầu có củ cho đến lúc thu hoạch và trong cả quá trình bảo quản. Hiện nay, việc khắc phục các tác hại của bọ hà gây ra là vấn đề khó khăn nhất đối với các nước trồng cây khoai lang [4].

Nhiều biện pháp phòng trừ sâu hại nói chung và bọ hà nói riêng đã được triển khai nhưng đều cho hiệu quả thấp. Các chế phẩm hoá học vẫn được dùng nhiều trong phòng trừ sâu hại cây trồng và bảo quản nông sản điều này gây ảnh hưởng rất lớn đến an toàn thực phẩm và môi trường. Gần đây, để đáp ứng yêu cầu phát triển nông nghiệp sạch, nông nghiệp sinh thái nhiều nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm sinh học an toàn hơn đang được khuyến khích sử dụng thay thế các chế phẩm hoá học. Tuy nhiên hạn chế lớn nhất của các chế phẩm sinh học là chất lượng thuốc không ổn định, hiệu quả không nhanh và không kịp thời [5]. Công nghệ sinh học ngày nay đang phát triển một phương pháp mới để chống lại bọ hà. Đó là việc chuyển các gen có hoạt tính diệt bọ hà vào cây khoai lang thông qua các hệ thống chuyển gen ở thực vật. Cây khoai lang chuyển gen sẽ có khả năng tự tạo ra được các protein độc tố trong cây và củ để chống lại bọ hà.

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) là loài sinh ra protein độc tố cry (*crystal*) gây chết đối với côn trùng ăn phải vì thế Bt được nghiên cứu sử dụng rộng rãi nhất để trừ sâu hại. Tuy nhiên đối với bọ hà là loài sâu hại thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera) vẫn chưa có loại gen cry thích hợp cho hiệu quả diệt sâu cao. Gần đây, có một nhóm protein mới được phát hiện gọi là VIP (Vegetative Insecticidal Protein) hình thành trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng của Bt. Nhóm protein này có hoạt lực và phổ diệt sâu này mạnh hơn nhiều so với nhóm gen cry [9]. Xuất phát từ thực tế trên chúng tôi tiến hành "Xây dựng thư viện ADN của chủng *Bacillus thuringiensis* AB51 có hoạt tính kháng bọ hà khoai lang" nhằm phục vụ mục tiêu sàng lọc gen mã hoá cho protein có hoạt tính diệt bọ hà. Để tiến tới phân lập gen và chuyển gen có hoạt tính diệt bọ hà vào cây khoai lang.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng *Bacillus thuringiensis* AB.51 do Syngenta cấp, đã được phòng Công nghệ Tế bào Thực vật sàng lọc và khẳng định có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang.

Phương pháp

Tách chiết ADN tổng số của Bt [9]

Qui trình: Hoà tan 10 đầu que cấy cấy tế bào vào 4ml TE có bổ sung 2mg/ml lysozym. Ủ ở 37°C trong 1 giờ, thêm proteinase K tới 100 µg/ml, ủ tiếp ở 37°C trong 1 giờ. Bổ sung urea 7M tới nồng độ 1M, EDTA đến 50mM và SDS đạt nồng độ 1%. Trộn đều mẫu sau mỗi lần thêm các chất. Ủ hỗn hợp trên ở 55°C qua đêm. Tách chiết 1 lần với phenol: chloroform (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), ly tâm 5 phút ở 4°C. Tủa dịch chiết bằng isopropanol (tỉ lệ 1:1) qua đêm. Ly tâm thu tủa 12000 vòng/phút 4°C, rửa cặn ADN 3 lần bằng cồn 70%. Để khô ADN ở nhiệt độ phòng, hoà tan trong TE, bảo quản ở 4°C.

Hoá chất: (1) Đệm tách ADN: TE (Tris- HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM); Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 50mM pH 8; Proteinase K 100µg/ml; urea 1M; SDS 1%; (2) Phenol-chloroform (25:24); (3) Isopropanol
Xây dựng thư viện ADN genome:

Các phương pháp được tiến hành theo qui trình trong các Kit của hãng Stratagene [6].

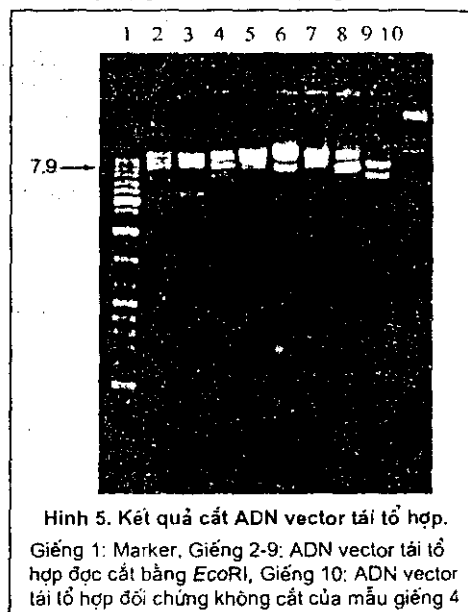
lạc đã xuất hiện do vector tự kết dính (hình 4A)

Với kích thước hệ gen *Bt* khoảng từ $2,4 \times 10^6$ đến $5,7 \times 10^6$ bp và kích thước các đoạn xen ADN cần nghiên cứu vào khoảng 30- 40 kb thì số các dòng cần thiết ở thư viện gen sơ cấp được tính theo công thức $N = \ln(1-p) / \ln(1-a/b)$. Để đánh giá kết quả chính xác chúng tôi đã chọn $p = 0,99$. Kết quả nhận được số dòng cần thiết đại diện cho toàn bộ hệ gen của vi khuẩn *Bt* là từ 384 đến 875 dòng. Từ các kết quả của các thí nghiệm trên đây thu được thư viện gen sơ cấp của chủng BtAB51 (khoảng 700 khuẩn lạc) (tình 4B). Có thể xem thư viện gen sơ cấp đầu tiên đủ độ tin cậy cho các phân tích tiếp theo.

Đánh giá mức đa dạng của thư viện gen

Một thư viện gen tốt phải chứa các đoạn gen đại diện cho toàn bộ hệ gen của sinh vật nghiên cứu. Thể hiện bằng các dòng trong thư viện phải có mức độ đa dạng cao, các dòng đó phải mang các vector tái tổ hợp chứa các đoạn ADN khác nhau không hoàn toàn (có các phần gối lên nhau). Đồng thời các ADN đoạn xen khác nhau nên chúng có số điểm nhận biết và vị trí nhận biết khác nhau đối với cùng một enzym giới hạn. Do đó khi xử lý các dòng tế bào mang các vector tái tổ hợp khác nhau với cùng 1 enzym giới hạn, sản phẩm cắt của các dòng đó có thể khác nhau.

Trong thí nghiệm này chúng tôi đã cắt hạn chế 8 dòng bằng *EcoRI*. Kết quả điện di trên hình 5 thấy các dòng đều xuất hiện các băng khác nhau và một băng có kích thước khoảng 7,9 kb. Điều này được giải thích vì theo thiết kế của vector SuperCos1 *EcoRI* sẽ cắt vector ở hai vị trí 1 và 65. Trong khi đó điểm gắn ADN đoạn xen ở vị trí 32. Theo tính toán như vậy, khi xử lý bằng enzym này đoạn vector ADN bị văng ra sẽ có kích thước khoảng 7,9kb và các đoạn xen ADN bị cắt bởi *EcoRI* khác nhau ở mỗi dòng. Từ các kết quả trên các dòng trong thư viện gen có thể được kết luận rằng có mức độ đa dạng khá cao và thư viện nhận được đủ tiêu chuẩn cho thí nghiệm sàng lọc và tìm kiếm gen tiếp theo.



Hình 5. Kết quả cắt ADN vector tái tổ hợp.

Giếng 1: Marker, Giếng 2-9: ADN vector tái tổ hợp được cắt bằng *EcoRI*, Giếng 10: ADN vector tái tổ hợp đối chứng không cắt của mẫu giếng 4

KẾT LUẬN

Đã tách được ADN hệ gen đạt độ sạch cao ($OD_{260}/OD_{280} = 1,87$) từ chủng BtAB51 có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang và thiết kế thành công thư viện ADN hệ gen BtAB51 trên cơ sở ghép nối các phân đoạn trên vào vector SuperCos1.

Thư viện ADN hệ gen của chủng BtAB51 được đánh giá bằng cách cắt hạn chế với *EcoRI*. Kết quả cho thấy các phân đoạn ADN được gắn vào vector có kích thước khác nhau, chứng tỏ thư viện đảm bảo chất lượng tối đủ tiêu chuẩn dùng cho việc sàng lọc tìm kiếm gen tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. David Rawn J. 1989. *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers. pp. 985-986
2. Hồ Huỳnh Thuý Dương, 1997. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo dục. Tr. 173-184
3. Lê Đình Lương, 2001. *Nguyên lý kỹ thuật di truyền*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật. Tr. 56-91
4. Nguyễn Trung Nam, Vũ Đình Hoà, Đinh Sơn Quang, Nguyễn Thị Bích Thuý, Võ Thị Thứ, Lê Trần Bình, 2001. *Sàng lọc các chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis phục vụ cho việc phân lập gen kháng bọ hà ở khoai lang*. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học - 2001, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật. Tr. 206-213
5. Phạm Văn Lâm, 2002. *Kỷ yếu hội thảo quốc gia về khoa học và công nghệ Bảo vệ thực vật*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Tr. 164-172
6. SuperCos 1 Cosmid vector, DNA ligation, Gigapack III Gold packaging extract kits, 2001. Stratagene.
7. Võ Thương Lan, 2001. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo dục. Tr. 13-14
8. Vance Kramer, 2002. *Protocol of DNA isolation for Cosmid library*. Syngenta
9. Victor A. Dossa, K. Anup Kumara, R. Jayakumara and Vaithilingam Sekar, 2002. *Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of Bacillus thuringiensis in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification 26: 82-88

SUMMARY

CONSTRUCTION A GENOMIC LIBRARY OF THE *B.THURINGIENSIS* ACTIVE
STRAIN BT.AB51 AGAINST SWEETPOTATO WEEVIL

Pham Thi Tra, Pham Bich Ngoc, Nguyen Trung Nam, Le Tran Binh
Institute of Biotechnology, NCST
Nguyen Van Mui
University of Natural Science, HNU

Total DNA genome of Bt strain AB51 against sweetpotato weevil was successfully isolated (OD 260/280= 1,87). It then was partially digested with *Sau3A* and ligated with *Bam*HI digested superCos 1 vector. The genome library was assessed by digestion with *Eco*RI. The results showed that Bt DNA fragments of greatly varying sizes were inserted in to vectors, indicative of good quality in order to carry out screening for active gene(s).

3B.O.20

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁI SINH CÂY BÔNG (*GOSSYPIMUM HIRSUTUM*. L) TỪ PHÔI SOMA

Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG
Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyền
Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây có sợi (RICFC)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng sản lượng xơ bông, sản phẩm của cây bông vải (*Gossypium hirsutum*. L) là yêu cầu cấp thiết của ngành dệt may nước ta, nhằm giảm lượng nhập khẩu hiện nay là 90% [8,9]. Tuy nhiên, trở ngại lớn nhất trong việc nâng cao sản lượng bông và mở rộng diện tích canh tác là làm thế nào để tạo được các giống bông kháng sâu. Phương pháp chọn giống truyền thống từ trước tới nay đã đem lại những kết quả tương đối khả quan nhưng tốn nhiều thời gian và hiệu quả không cao. Phương pháp chuyển gen tỏ ra có hiệu quả hơn vì cây chuyển gen không những giữ nguyên được đặc tính trong di truyền mà còn tăng cường thêm tính trạng mong muốn như chống chịu với sâu bệnh. Hiện nay trên thế giới, bông chuyển gen kháng sâu đã được trồng ở nhiều nước như Trung Quốc, Mỹ, Mexico, Nam Mỹ... và đã đem lại những lợi nhuận to lớn cho người trồng bông do giảm lượng thuốc trừ sâu sử dụng dẫn đến giảm giá thành sản xuất. Chẳng hạn như Trung Quốc đã bắt đầu trồng bông kháng sâu từ năm 1997, số lần phun thuốc trừ sâu giảm từ một nửa đến hai phần ba, nên giá thành sản xuất giảm 20% mỗi kilogam xơ bông [6].

Để tiến hành việc chuyển gen vào cây bông thì trước tiên cần phải thiết lập và tối ưu cho được hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây *in vitro*. Cho đến nay các kết quả về tái sinh cây bông trên thế giới mới chỉ thành công ở một vài giống. Vì vậy mục đích của chúng tôi là nghiên cứu quy trình tái sinh cây cho một số giống bông Việt Nam từ phôi soma phục vụ công tác chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Môi trường cơ bản (MS0) được sử dụng trong nghiên cứu gồm các muối đa lượng và vi lượng theo Murashige và Skoog [7], Vitamin B5 theo Gamborg [5], 0,75 g/L $MgCl_2$, 30 g/L glucoza và 9g/L thạch. Nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 2°C và chế độ chiếu sáng 8h/16h với cường độ ánh sáng 2000 lux.

Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu tạo mô sẹo

Các giống bông nghiên cứu gồm SSR 60F, 254 và VN36P do Viện Nghiên cứu Cây Bông và Cây Có Sợi cung cấp. Trước hết, xử lý hạt bông với axit sunfuric 98% trong 3 phút để loại xơ. Sau đó khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút và lắc hạt trong dung dịch Javen 60% trong 20 phút. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần, thấm khô và cấy lên môi trường MS0 không có chất điều khiển sinh trưởng. Khi cây non được 10-15 ngày tuổi, tiến hành lấy nguyên liệu tạo mô sẹo.

Cảm ứng tạo mô sẹo

Bảng 1. Thành phần các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo

Các loại môi trường và tên môi trường	Thành phần chất điều khiển sinh trưởng			
	2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Zeatin (mg/L)	NAA (mg/L)
Tổ hợp loại 1	MS1	0,10	0,10	-
	MS2	0,20	0,10	-
	MS3	0,40	0,10	-
	MS4	0,10	0,20	-
	MS5	0,20	0,20	-
	MS6	0,40	0,20	-
	MS7	0,10	0,40	-
	MS8	0,20	0,40	-
	MS9	0,40	0,40	-
Tổ hợp loại 2	MSR1	-	0,50	0,50
	MSR2	-	0,50	1,00
	MSR3	-	0,50	1,50
	MSR4	-	0,50	2,00
	MSR5	-	0,50	2,50
	MSR6	-	0,50	3,00
Tổ hợp loại 3	MSC1	-	-	0,10
	MSC2	-	-	0,50
	MSC3	-	-	1,00
	MSC4	-	-	2,00
	MSC5	-	-	0,10
	MSC6	-	-	0,50
	MSC7	-	-	1,00
	MSC8	-	-	2,00
	MSC9	-	-	0,10
	MSC10	-	-	0,50
	MSC11	-	-	1,00
	MSC12	-	-	2,00

Dấu "-": không có

Nguyên liệu tạo mô sẹo gồm các đoạn thân mầm kích thước 10mm và mẫu lá mầm kích thước 4mm x 4mm. Khả năng cảm ứng tạo mô sẹo được khảo sát nghiên cứu trên 24 môi trường thuộc 3 loại tổ hợp chất điều khiển sinh trưởng sau: kết hợp 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và kinetin; kết hợp kinetin và 1-Naphthyl acetic acid (NAA); và kết hợp zeatin và NAA (bảng 1). Sau 4 tuần, đánh giá các mô sẹo sơ cấp đã tạo được.

Nhân mô sẹo

Để chọn ra môi trường thích hợp cho việc nhân mô sẹo có khả năng tạo phôi tốt nhất, toàn bộ mô sẹo sơ cấp được cấy chuyển sang 3 loại môi trường khác nhau về nồng độ các chất điều khiển sinh trưởng tương ứng: giữ nguyên (MS1-MS9; MSR1-MSR9; MSC1-MS9), giảm thiểu (NMSa,b; NMSRa,b; NMSCa,b và loại bỏ hoàn toàn (MS0) (bảng 2). Sau đó chuyển mô sẹo sang môi trường cảm ứng tạo phôi MS0. Chẳng hạn cấy chuyển mô sẹo sơ cấp từ MS1 sang 4 môi trường là MS1, NMSa, NMSb và MS0. Lấn cấy chuyển tiếp theo chỉ sử dụng môi trường MS0.

Bảng 2. Thành phần các môi trường nhân mô sẹo đã giảm hàm lượng chất điều khiển sinh trưởng

Môi trường cảm ứng mô sẹo	Môi trường nhân mô sẹo tương ứng	Thành phần chất điều khiển sinh trưởng			
		2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Zeatin (mg/L)	NAA (mg/L)
Tổ hợp loại 1	NMSa	0,10	0,10	-	-
	NMSb	0,05	0,05	-	-
	MS0	-	-	-	-
	NMSRa	-	0,25	-	0,25
Tổ hợp loại 2	NMSRb	-	-	-	0,5
	MS0	-	-	-	-
	NMSCa	-	-	0,10	0,01
Tổ hợp loại 3	NMSCb	-	-	0,05	0,01
	MS0	-	-	-	-

Sự hình thành phôi và tái sinh cây

Sau 2-4 lần cấy chuyển, một số khối mô sẹo đã phát triển thành phôi. Sau khi phôi hình thành, tiếp tục cấy chuyển phôi lên môi trường MS0 để phôi này mầm và tái sinh cây.

Ra cây

Tiến hành đưa cây ra điều kiện tự nhiên khi cây *in vitro* đạt kích thước 8-10 cm. Cho cây làm quen với điều kiện ánh sáng và nhiệt độ ngoài trời trong 3 ngày trước khi chuyển sang bầu đất. Ba công thức của bầu đất được thử nghiệm là (1) 100% cát; (2) 1/2cát:1/2 đất; và (3): 1/3 đất:1/3 cát:1/3 trấu toàn tính. Sau 4 tuần, chuyển cây sang chậu đất, chăm sóc và theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây tái sinh trong nhà lưới.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cảm ứng tạo mô sẹo

Khả năng hình thành mô sẹo của 3 giống bông nghiên cứu không có sự khác nhau rõ rệt về tỉ lệ và tốc độ phát triển. Tỉ lệ hình thành mô sẹo cao và đồng đều nhất ở tổ hợp kinetin và NAA và thấp nhất ở tổ hợp 2,4-D và kinetin. Tốc độ phát triển mô sẹo cao nhất ở tổ hợp kinetin và NAA và thấp nhất ở tổ hợp zeatin

Bảng 3. Ảnh hưởng của các tổ hợp hoặc môn sinh trưởng khác nhau lên sự hình thành mô sẹo và phôi soma của các giống bông SSR60F, 254 và VN36P

Tổ hợp	Môi trường	Loại mẫu vật	Số mẫu vật			Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)			Tỉ lệ mô sẹo tạo phôi (%)			Sự phát triển của mô sẹo		
			SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P
Tổ hợp loại 1	MS1	thân mầm	46	50	50	60	50	70	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	32	30	30	70	51	70	0	0	0	+	+	++
	MS2	thân mầm	49	50	50	80	66	82	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	32	30	30	75	72	83	0	0	0	++	+	++
	MS3	thân mầm	63	50	50	100	90	90	0	0	0	++	++	++
		lá mầm	32	30	30	75	95	100	0	0	0	++	++	++
	MS4	thân mầm	48	50	50	79	63	70	7	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	76	67	70	0	0	0	+	+	++
	MS5	thân mầm	35	50	50	78	79	71	8	0	0	++	+	++
		lá mầm	33	30	30	85	78	75	0	0	0	++	+	++
	MS6	thân mầm	30	50	50	100	80	80	0	0	0	+++	++	++
		lá mầm	34	30	30	95	79	90	0	0	0	+++	++	++
	MS7	thân mầm	37	50	50	75	53	69	0	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	87	54	81	0	0	0	++	+	++
	MS8	thân mầm	30	50	50	79	68	90	0	0	0	++	+	++
		lá mầm	32	30	30	97	70	90	0	0	0	++	+	++

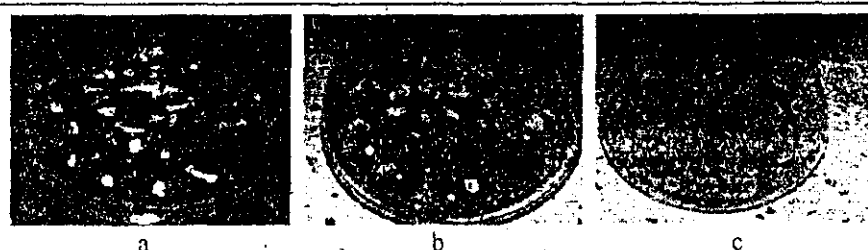
Bảng 3. Ảnh hưởng của các tổ hợp hoóc môn sinh trưởng khác nhau lên sự hình thành mô sẹo và phôi soma của các giống bông SSR60F, 254 và VN36P (tiếp theo)

Tổ hợp	Môi trường	Loại mẫu vật	Số mẫu vật			Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)			Tỉ lệ mô sẹo tạo phôi (%)			Sự phát triển của mô sẹo		
			SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P	SSR	254	VN36P
Tổ hợp loại 2	MS9	thân mầm	30	50	50	79	77	100	0	0	0	+++	++	++
		lá mầm	32	30	30	82	88	90	0	0	0	+++	++	++
	MSR1	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR2	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR3	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR4	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
	MSR5	thân mầm	30	50	50	100	100	100	10	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	++
Tổ hợp loại 3	MSR6	thân mầm	30	50	50	100	100	100	0	0	0	+++	++	+++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	++	++	+++
	MSC1	thân mầm	45	30	30	100	98	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	90	100	0	0	0	+	+	+
	MSC2	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
	MSC3	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
	MSC4	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	84	100	0	0	0	+	+	+
	MSC5	thân mầm	45	30	30	100	95	100	10	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	97	100	0	0	0	+	+	+
Tổ hợp loại 4	MSC6	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
	MSC7	thân mầm	45	30	30	100	100	100	12	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	++
	MSC8	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
	MSC9	thân mầm	45	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	100	100	0	0	0	+	+	+
	MSC10	thân mầm	45	30	30	100	85	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	79	100	0	0	0	+	+	+
	MSC11	thân mầm	45	30	30	100	95	100	0	0	0	+	+	++
		lá mầm	30	30	30	100	96	100	0	0	0	+	+	++
Tổ hợp loại 5	MSC12	thân mầm	45	30	30	100	98	100	0	0	0	+	+	+
		lá mầm	30	30	30	100	89	100	0	0	0	+	+	+

và NAA. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa mô sẹo hình thành từ lá mầm và mô sẹo hình thành từ thân mầm (bảng 3). Tốc độ hình thành và phát triển của mô sẹo tỉ lệ thuận với nồng độ 2,4-D trong tổ hợp loại 1 nhưng không dao động lớn trong hai tổ hợp còn lại.

Về hình thái, các tổ hợp 2,4-D và kinetin tạo mô sẹo trắng và cứng (hình 1a), các tổ hợp kinetin và NAA tạo mô sẹo trắng kèm theo rễ (hình 1b), trong khi đó các tổ hợp zeatin và NAA luôn cho mô sẹo xám và mỏng nước (hình 1c), độ mỏng nước tỉ lệ thuận với nồng độ zeatin.

Mặc dù thí nghiệm nghiên cứu đã sử dụng 27 loại / môi trường cho 3 giống bông, nhưng chúng tôi chưa xác định được môi trường cảm ứng tạo mô sẹo thích hợp



Hình 1. Sự hình thành mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy giống bông 254

a. trên môi trường có 2,4-D và Kinetin (MS4); b. trên môi trường có Kinetin và NAA (MSR11)
c. trên môi trường có Zeatin và NAA (MSC8)

nhất vì khả năng tạo phôi còn phụ thuộc vào quá trình cấy chuyển của mô sẹo.

Số lượng dấu + chỉ kích thước của mô sẹo sau 4 tuần trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo; dấu cộng nhiều hơn chỉ mức độ phát triển cao hơn.

Nhân mô sẹo

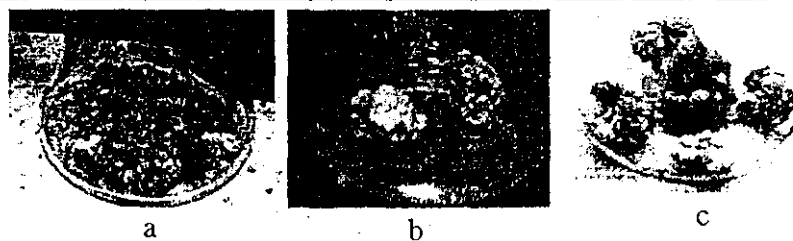
36 tổ hợp môi trường (bảng 1 và 2) đã được sử dụng cho việc khảo sát để tìm môi trường nhân mô sẹo đối với ba giống bông SSR60F, 254 và VN36P. Quan sát tốc độ sinh trưởng phát triển cũng như cấu trúc hình thái chúng tôi có nhận xét như sau.

Mô sẹo phát triển nhanh nhưng tỉ lệ chết cao trên môi trường nhân mô sẹo vẫn giữ nguyên nồng độ chất điều khiển sinh trưởng tương ứng (hình 2a). Tỉ lệ chết tỉ lệ thuận với nồng độ hoặc môn sinh trưởng trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo ban đầu. Chẳng hạn sau khi cấy chuyển mô sẹo sơ cấp từ MS1 lần thứ nhất lên chính MS1, 73% mô sẹo sống sót, sau lần cấy chuyển thứ hai lên MS0 thì chỉ 53% sống sót. Trong khi đó, hai tỉ lệ tương ứng đối với môi trường MS3 có nồng độ 2,4-D cao hơn là 43% và 13%. Đặc điểm mô sẹo là nâu xám và mọng nước.

Ngược lại, mô sẹo phát triển chậm hơn những tỉ lệ sống sót cao hơn trên môi trường nhân mô sẹo giảm và cao nhất trên môi trường không bổ sung chất điều khiển sinh trưởng (hình 2b,c). Hai hình thái điển hình là mô sẹo hơi xanh và cứng (hình 2b) hoặc vàng nhạt và lồi xốp, dễ vỡ ra thành các hạt nhỏ (hình 2c). Theo một số công bố [1, 11] thì loại mô sẹo này sẽ có khả năng tạo phôi cao.

Sau thời gian 1 năm mô sẹo của hầu hết các giống đều không phát triển thành phôi và chết. Tuy nhiên, chỉ riêng ở giống bông SSR60F, loại mô sẹo xốp và vàng nhạt dần dần hình thành phôi soma. Do đó môi trường MS0 cũng được gọi là môi trường cảm ứng tạo phôi.

Như vậy theo chúng tôi có thể trong quá trình nuôi cấy, các khối mô sẹo bông có khả năng tạo hoặc môn nội sinh, vì thế môi trường nhân mô sẹo không cần bổ



Hình 2. Nhân mô sẹo giống VN 36P

a. Trên môi trường giữ nguyên nồng độ 2,4-D và kinetin so với môi trường cảm ứng mô sẹo b,c. Trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng đó b: loại mô sẹo cứng, hơi xanh. c: loại mô sẹo xốp, hơi vàng.

Bảng 4. Tỉ lệ mô sẹo sống sót sau khi cấy chuyển lên các môi trường nhân mô sẹo

Môi trường cảm ứng mô sẹo	Môi trường cấy chuyển lần 1	Môi trường cấy chuyển lần 2	Số mô sẹo cấy chuyển	Mô sẹo sống sót sau lần cấy chuyển 1		Số mô sẹo sống sót sau lần cấy chuyển 2	
				Số lượng	tỉ lệ	Số lượng	tỉ lệ
MS1	MS1	MS0	15	11	73%	8	53%
	NMSa	MS0	20	13	65%	10	50%
	NMSb	MS0	18	13	72%	9	50%
MS2	MS0	MS0	21	21	100%	21	100%
	MS2	MS0	19	10	53%	5	26%
	NMSa	MS0	25	20	80%	19	76%
	NMSb	MS0	20	18	90%	17	85%
MS3	MS0	MS0	21	21	100%	21	100%
	MS3	MS0	23	10	43%	3	13%
	NMSa	MS0	24	18	75%	16	67%
	NMSb	MS0	24	17	71%	14	58%
MS4	MS0	MS0	24	23	96%	22	92%
	MS4	MS0	19	19	100%	7	37%
	NMSa	MS0	21	19	90%	18	86%
	NMSb	MS0	21	21	100%	18	86%
MS5	MS0	MS0	19	19	100%	19	100%
	MS5	MS0	20	15	75%	5	25%
	NMSa	MS0	20	18	90%	16	80%
	NMSb	MS0	20	18	90%	16	80%
MS6	MS0	MS0	20	20	100%	20	100%
	MS6	MS0	20	5	25%	3	15%
	NMSa	MS0	20	10	50%	8	40%
	NMSb	MS0	20	10	50%	8	40%
MS7	MS0	MS0	20	15	75%	15	75%
	MS7	MS0	20	18	90%	10	50%
	NMSa	MS0	20	20	100%	20	100%
	NMSb	MS0	20	20	100%	20	100%
	MS0	MS0	20	20	100%	20	100%

sung thêm chất điều khiển sinh trưởng. Vấn đề này cũng đã được phát hiện ở một số loại cây trồng trong nuôi cấy *in vitro* [2].

Sự hình thành phôi và tái sinh cây

Tỉ lệ loại mô sẹo có khả năng hình thành phôi trung bình là 10%. Trong một khối mô sẹo quan sát thấy phôi soma có 3 dạng khác nhau: hình cầu (globular), hình tim (heart) và hình quả lựu đạn (torpedo) (hình 3 a,b). Chỉ mô sẹo từ thân mầm mới phát triển thành phôi, mặc dù quá trình hình thành và phát triển rất giống với mô sẹo từ lá mầm. Thêm nữa, mặc dù mô sẹo của các giống như 254, VN36P và một số giống khác mà chúng tôi không đưa ra số liệu ở đây, cũng có dạng vàng nhạt và hơi xốp, nhưng không thấy phát triển thành phôi soma. Rõ ràng khả năng tái sinh cây bông phụ thuộc chặt chẽ vào kiểu gen và loại mẫu vật nuôi cấy. Nhận xét của chúng tôi cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây [3,4,10,12].

Mô sẹo có khả năng tạo phôi soma xuất phát từ các môi trường MS4, MS5 và MS9; MSR5; MSC5 và MSC7. Kết hợp bảng 2 và 3, các tổ hợp và nồng độ chất điều khiển sinh trưởng thích hợp để tạo mô sẹo là 0,1-0,4mg/L 2,4-D + 0,2-0,4mg/L kinetin; 0,5mg/L kinetin + 2,5mg/L NAA; và 0,1-1mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA.

Tuy nhiên đây mới chỉ là kết quả ban đầu cần phải tiếp tục nghiên cứu để tối ưu hoá quy trình tái sinh phục vụ công việc chuyển gen.

Tái sinh và ra cây

Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng chỉ cho phôi nảy mầm cũng trên môi trường MS0. Khoảng 30% cây nảy mầm *in vitro* có những đặc điểm khác thường: chỉ có 1 lá, thân uốn cong, có thể là kết quả của biến dị soma trong quá trình mô sẹo hoá (hình 3c). Tỉ lệ cây sống sót cao nhất là 90%, đạt được khi đưa ra bầu đất có thành phần 1 đất:1 cát:1 trấu toàn tính.

KẾT LUẬN

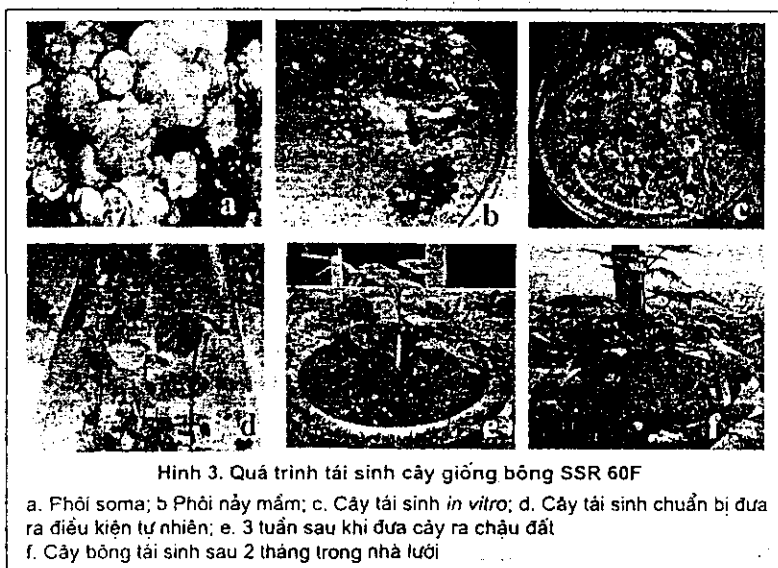
Đã tìm ra được các tổ hợp chất điều khiển sinh trưởng thích hợp cho việc tạo mô sẹo ở cây bông là: 0,1-0,4mg/L 2,4-D + 0,2-0,4mg/L kinetin; 0,5mg/L kinetin + 2,5mg/L NAA; và 0,1-1mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA.

Trong các giống bông đã khảo sát, chỉ có giống bông SSR60F là có khả năng tạo phôi soma và tái sinh cây.

Quy trình tái sinh cây bông theo con đường tạo phôi soma bắt đầu từ việc tạo mô sẹo từ thân mầm của cây non 10-15 ngày tuổi sau đó cấy chuyển nhiều lần trên môi trường không có chất điều khiển sinh trưởng cho đến khi phôi hình thành và tạo cây hoàn chỉnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ape T., Kudo M., Oka Y., Yamaguchi J., and Sasahara T. 1996. *Changes in α-amylase activity during plant regeneration from rice calli*. J Plant Physiol 149: 592-598.
2. Dix P.J. 1990. *Plant cell line selection (Procedures and Applications)*. VCH Verlagsgesellschaft MBH.
3. Finer J.J. 1990. *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum L.) via particle bombardment*. Plant Cell Reports 8: 586-589.
4. Firoozabady E. 1986. *Isolation, culture and cell division in cotyledon protoplast of cotton (Gossypium hirsutum and G. barbadense)*. Plant Cell Reports 5: 127-131.
5. Gamborg O., R. Miller, and K. Ojima. 1968. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp.Cell.Res 50: 105-116.
6. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. 2003. *Bt Cotton in China*.



7. Murashige T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 437-497.
8. Nguyễn Hữu Bình. Kế hoạch phát triển bông đến 2005-2010 và những giải pháp chủ yếu. 2001. Công ty Bông Việt Nam. Tổng Công ty Dệt-May Việt Nam, 2.
9. Quyết định số 55/2001/QĐ-TTg ngày 23/4/2001 của Thủ tướng Chính phủ.
10. Rajasekaran K. 1996. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 15: 859-864.
11. Raghava R.N.V., Nabors M.V. 1992. Plant regeneration from tissue cultures of Pokkali rice is promoted by optimizing callus to medium volume ratio and by a medium conditioning factor produced by embryogenic callus. *Cell Tiss Org cult* 4: 241-248.
12. Trolinder, N. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 6:231-234.
13. Umbeck P. 1985. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Biotechnology* 5: 263-266.

Kết quả nghiên cứu trên thuộc đề tài cấp nhà nước KC.04.13

SUMMARY

STUDY ON PLANT REGENERATION VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COTTON (*GOSSYPIMUM HIRSUTUM* L.)

Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường,
Đinh Thị Phong, Lê Thị Muoi, Lê Trần Bình
Institute of Biotechnology (IBT), NCST
Trình Minh Hợp, Lê Quang Quyền
Research Institute for Cotton and Fiber Crop (RICFC)

Three cotton cultivars 254, VN36P and SSR60F were studied for ability of regeneration via somatic embryogenesis. The optimal phyto-hormone combinations for callus induction in cotton were found to be: 0.1-0.4mg/L 2,4-D + 0.2-0.4mg/L kinetin; 0.5mg/L kinetin + 2.5mg/L NAA; and 0.1-1mg/L zeatin + 0.05 mg/L NAA. Among the studied cotton cultivars, only cultivar SSR60F was able to form somatic embryos and regenerate into plantlets.

The procedure for cotton plant regeneration via somatic embryogenesis starts with callus induction from hypocotyl explants of 10-15 days seedlings followed with subcultures of calli onto media without plant growth regulators until embryos formed and germinate into plantlets.

BÀI TỔNG QUAN

CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN: THỰC TRẠNG VÀ TRIỂN VỌNG

Lê Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc,
Nông Văn Hải, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Các kỹ thuật sinh học truyền thống như kỹ thuật lai chọn giống đã được con người sử dụng hàng ngàn năm qua để tạo ra những cây trồng có các đặc tính riêng biệt. Tuy nhiên, những kỹ thuật này đòi hỏi nhiều thời gian và có thể phải trải qua nhiều thế hệ mới có được những tính trạng mong muốn và loại bỏ những đặc tính không cần thiết. Công nghệ sinh học sử dụng kỹ thuật di truyền để biến đổi cây trồng bằng cách đưa những gen có giá trị vào bộ gen của cây nhận (thậm chí kể cả gen của các loài vốn không có quan hệ họ hàng) và nhanh chóng tạo ra các cây trồng biến đổi di truyền (Genetically Modified - GM) hay thường gọi là cây trồng biến đổi gen mang những đặc tính mong muốn. Các cây trồng GM có thể đem lại những lợi ích quan trọng như tăng tính chống chịu, tăng năng suất, giảm chi phí sử dụng thuốc trừ sâu hóa học, tăng lợi nhuận và cải thiện môi trường cũng như sức khỏe con người... Công nghệ sinh học hiện đại và các cây trồng GM đã và đang được ứng dụng rộng rãi, có những đóng góp đáng kể và tạo ra những ảnh hưởng sâu sắc ở quy mô toàn cầu. Rất nhiều quốc gia trên thế giới, dẫn đầu là Hoa Kỳ, Argentina, Canada và Trung Quốc, đang tiến hành nghiên cứu, thương mại hoá các cây trồng GM. Một số quốc gia Đông Nam Á cũng đang nhập cuộc. Ở Việt Nam, các loại cây trồng này cũng đang được tiếp cận nghiên cứu và triển khai. Bên cạnh những lợi ích to lớn, những ảnh hưởng bất lợi có thể xảy ra đối với hệ sinh thái cũng như sức khỏe con người khi đưa các cây trồng GM ra môi trường tự nhiên cũng nhận được sự quan tâm của nhiều quốc gia trên thế giới. Hàng loạt cơ chế, quy định quản lý hiệu quả đã và đang được thực thi nhằm tăng cường hơn nữa khả năng ứng dụng của các sản phẩm công nghệ sinh học hiện đại có giá trị này.

Từ khóa: An toàn sinh học, cây trồng biến đổi gen, công nghệ sinh học, kỹ thuật biến đổi di truyền, kỹ thuật sinh học truyền thống, sinh vật biến đổi gen

MỞ ĐẦU

Theo dự đoán, dân số toàn cầu sẽ tăng gấp đôi vào năm 2050 và trong vòng 30 năm tới, an ninh lương thực sẽ trở thành vấn đề bức xúc của xã hội. Sản xuất lương thực có lẽ phải tăng gấp đôi hoặc gấp ba mới có thể

đáp ứng được nhu cầu cho 6 tỷ người trên thế giới (Herrera-Estrella, 2000). Có nhiều cách để tăng sản lượng nông nghiệp như sử dụng phân bón sinh học, tăng cường các biện pháp khống chế sâu bệnh, bảo tồn nguồn nước và đất, gieo trồng các giống cây trồng cải tiến tạo ra nhờ những phương pháp

truyền thống hoặc hiện đại... Trong các biện pháp trên, việc đưa vào ứng dụng các cây trồng biến đổi di truyền (Genetically Modified - GM) có thể sẽ đem lại triển vọng lớn nhất đối với vấn đề đảm bảo an ninh lương thực toàn cầu.

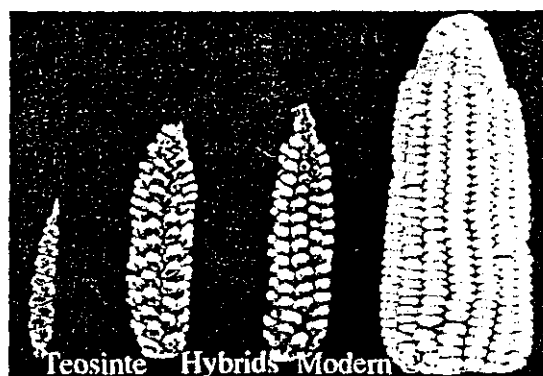
Cây trồng biến đổi di truyền nói riêng cũng như sinh vật biến đổi di truyền nói chung (bao gồm động vật, thực vật và vi sinh vật) là các sản phẩm của công nghệ sinh học hiện đại, được con người tạo ra nhờ sử dụng các kỹ thuật phân tử để đưa gen mới vào bộ gen của cây trồng (hay sinh vật). Quá trình chỉnh sửa/sửa đổi này chỉ diễn ra trong phạm vi một vài gen. Vì vậy, thuật ngữ cây trồng/sinh vật biến đổi di truyền còn được gọi là cây trồng/sinh vật chỉnh sửa/sửa đổi gen hoặc cây trồng/sinh vật công nghệ sinh học. Thực phẩm được tạo ra từ các cây trồng/sinh vật GM này hay có chứa thành tố của chúng được gọi là thực phẩm biến đổi gen/thực phẩm GM (Genetically Modified Food - GMF) hay thực phẩm công nghệ sinh học.

Hiện nay, công nghệ sinh học hiện đại với các công nghệ cao, đặc biệt là công nghệ biến đổi di truyền đang được đầu tư phát triển trên thế giới và ứng dụng rộng rãi không chỉ tại các quốc gia phát triển. Nhận thức rõ tầm quan trọng của ngành khoa học mũi nhọn này đối với sự phát triển chung của xã hội các quốc gia đang phát triển cũng đang bắt đầu ưu tiên đầu tư cho công nghệ sinh học hiện đại để tạo ra các sản phẩm an toàn giá trị ứng dụng (Bùi Chí Bửu, 2003). Đặc biệt trong lĩnh vực công nghệ sinh học nông nghiệp trên quy mô toàn cầu, các quốc gia này (thủ nghiệm và thương mại hóa các sản phẩm) đều được triển khai rộng rãi và đạt được những thành tựu hết sức to lớn. Việc đưa vào ứng dụng các cây trồng GM có thể đem lại những mặt ưu và chất lượng nông sản, tăng khả năng chống chịu sâu bệnh và các điều kiện ngoại cảnh bất lợi...

Trong bài này, chúng tôi đặt vấn đề tìm hiểu về công nghệ biến đổi di truyền, các thành tựu, hiện trạng, triển vọng và quản lý an toàn cây trồng GM tạo ra nhờ kỹ thuật sinh học hiện đại trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

SƠ LƯỢC VỀ CÔNG NGHỆ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN

Trong lịch sử loài người, từ xa xưa nông dân đã biết sử dụng kỹ thuật lai chọn giống để cải tiến giống cây trồng, vật nuôi. Việc sử dụng liên tục và lai tạo các giống có chất lượng nhất là cơ sở để duy trì và tăng cường các đặc tính tốt qua nhiều thế hệ. Dựa trên sự đa dạng di truyền tồn tại sẵn trong quần thể, trong đó có các đột biến xảy ra ngẫu nhiên trong tự nhiên, nông dân và gần đây là các chuyên gia tạo giống đã chọn tạo được các giống động, thực vật mang các đặc tính mong muốn như kháng bệnh, có khả năng chống chịu với điều kiện môi trường khắc nghiệt, tăng sản lượng... Đến nay, kỹ thuật này đã tạo ra phần lớn giống cây trồng và vật nuôi sử dụng trong các nông trại và vẫn tiếp tục đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp (The Royal Society, 1999; Chrispeels, Sadava, 2002) (Hình 1).



Hình 1. Thuần hóa ngô từ Teosinte sử dụng kỹ thuật lai tạo giống

Ngày nay, với sự can thiệp của con người, quá trình chọn tạo giống có thể vượt qua các rào cản tự nhiên. Biến đổi di truyền, còn gọi là kỹ thuật di truyền, được hình thành từ những năm 1970, sử dụng các kỹ thuật nucleic acid trong ống nghiệm để phân lập các gen từ một hoặc nhiều cá thể động vật, thực vật và vi sinh vật, thiết kế và chuyển chúng vào trong nguyên liệu di truyền của tế bào ở các cá thể khác để tạo ra các sinh vật biến đổi di truyền. Khi đã được biến nạp vào tế bào sinh vật, thông qua quá trình sinh sản bình thường, trong các thế hệ con cháu có thể tìm thấy sự có mặt của những gen này ở các cá thể biến đổi di truyền (Goodman *et al.*, 1987; Mackenzie *et al.*, 2003).

Về bản chất, kỹ thuật lai chọn giống tiến hành lựa chọn các gen tái tổ hợp dựa trên các đa dạng di truyền tồn tại tự nhiên trong các cá thể động vật hoặc thực vật quan tâm. Vì vậy, kỹ thuật này cho phép chọn lọc và lai tạo giống với các tính trạng chịu ảnh hưởng của một vài hoặc nhiều gen riêng lẻ cũng như các tính trạng chịu sự kiểm soát của một gen. Lai giống thường xảy ra giữa các cá thể của cùng một loài hoặc trong một vài trường hợp, giữa các loài có quan hệ họ hàng. Ở đây, các nhà tạo giống không biến đổi nguyên liệu di truyền của các cá thể nghiên cứu. Trong khi ở kỹ thuật di truyền, các nhà khoa học tiến hành phân lập các gen riêng lẻ kiểm soát các tính trạng cụ thể, nhân chúng lên và thiết kế chúng với các nhân tố điều khiển tách từ các gen khác để tạo ra 'kết cấu gen' ('gene construct') nhằm đảm bảo chúng có thể hoạt động tốt trong các sinh vật đích. Sau đó, chúng được chuyển vào trong sinh vật đích thường ở các vị trí ngẫu nhiên. Các kỹ thuật sử dụng phương pháp GM liên quan đến các bước xảy ra ở mức phân tử bên ngoài cơ thể sinh vật. Việc ứng dụng các

kỹ thuật mới này đã tạo ra những bước phát triển vượt bậc trong quá trình tiến hóa. Thông qua sự biến đổi di truyền, gen được chuyển và biến đổi theo cách không thể xảy ra trong quá trình tiến hóa tự nhiên cũng như qua lai chọn giống như giữa các loài khác nhau và giữa động vật - thực vật và vi sinh vật. Rất nhiều rào cản tự nhiên có thể dễ dàng vượt qua như việc chuyển một hoặc nhiều gen giữa các cơ thể sinh vật không có quan hệ di truyền (Wright, 1994; Gelvin, 1998).

Công nghệ GM đã phát triển nhanh chóng trên nhiều đối tượng và được ứng dụng rộng rãi không chỉ trong nông nghiệp mà còn trong ngành dược và trong công nghiệp để sản xuất các hóa chất mới tinh khiết, các chất phụ gia thực phẩm và các dược phẩm sử dụng các "nhà máy" sản xuất ("factories") là các sinh vật GM. Ví dụ, trên đối tượng vi sinh vật, năm 1997, Cục Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (U.S Environment Protection Agency - EPA) đã phê chuẩn vi khuẩn GM đầu tiên được phép sử dụng trong nông nghiệp. Vi khuẩn này thuộc chủng *Rhizobium meliloti* có mang các gen phân lập từ năm loài khác nhau và được biến đổi di truyền nhằm tăng khả năng cung cấp đạm cho các cây cỏ linh lăng trên các nông trại (Van Aken, 2000). Trên đối tượng động vật, đầu năm 1988, nghiên cứu về chuột Harvard Oncomouse đã được cấp bằng sáng chế ở Hoa Kỳ. Đây cũng là động vật đầu tiên được biến đổi di truyền (Gordon, Ruddle, 1981). Sau đó vào những năm 1990, công nghệ này được áp dụng cho các đối tượng động vật như gia súc, lợn, cừu, chuột và gia cầm (Hammer *et al.*, 1985; Simons *et al.*, 1987). Công nghệ GM cũng đã được đưa vào ứng dụng trong nghề nuôi trồng thủy sản và các lĩnh vực nghiên cứu, triển khai khác.



Hình 1. Lúa nước biến đổi di truyền có khả năng kháng thuốc diệt cỏ (Nguồn: USDA)

NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN TRÊN THẾ CHÓI

Trên đối tượng thực vật, việc áp dụng công nghệ GM đã phải mất một thời gian dài mới đạt được thành công. Chương thí nghiệm chuyển gen đầu tiên đã sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để đưa gen AOH của nấm men và gen kháng thuốc diệt cỏ vào cây khoai tây (Horsch *et al.*, 1988). Từ đó, rất nhiều loài cây trồng đã được chuyển gen thành công, như cà chua, khoai tây, cải, hướng dương, dưa hấu, khoai lang (James, 1997; Wu, 1998) sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* mang vector PFG, bản gen. Các nghiên cứu đang mang ở việc hoàn thiện các phương pháp và mức hiệu chuyển gen thành công cho nhiều đối tượng cây trồng. Với công nghệ biến đổi di truyền các biến nạp và chuyển gen thông qua vi khuẩn cũng đã được áp dụng để chuyển các gen có giá trị dinh dưỡng vào cây trồng và ứng dụng đoạn gen kháng thuốc diệt cỏ vào cây trồng, cắt bớt thuốc diệt cỏ sử dụng trong canh tác, chúng cho phép giảm thiểu chi phí và bảo vệ môi trường.

nghiên cứu đã tiến hành tổng hợp nhân tạo một phần hoặc toàn phần gen có giá trị và sử dụng các mã di truyền phù hợp với từng loài cây trồng nhất định (Perlak *et al.*, 1991; Adang *et al.*, 1993; Altosaar *et al.*, 1997). Với những cải tiến đa dạng, hiệu quả chuyển gen và mức độ biểu hiện của hàng loạt gen có giá trị trong cây trồng GM đã tăng lên rất nhiều. Hoạt tính độc của protein Cry cải biến - protein độc tố có hoạt tính diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) do gen cry mã hóa, có thể cao gấp 100 lần so với hoạt tính của protein tự nhiên (Perlak *et al.*, 1991; Riazuddin *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1998). Ishida và cộng sự (1996) với phương pháp nuôi cấy *Agrobacterium* mang vector hai nguồn với phôi ngô chưa trưởng thành cho hiệu quả chuyển gen tăng từ 5% lên 30%. Sử dụng hệ thống vector hai nguồn chuẩn, Frame và cộng sự (2002) đã hoàn chỉnh quy trình chuyển gen vào ngô với hiệu quả cao.

Nhờ công nghệ GM, các gen có giá trị nông học có thể dễ dàng được chuyển vào bộ gen thực vật và được điều khiển biểu hiện ở những mô, cơ quan đặc biệt trong những giai đoạn phát triển nhất định. Số

lượng gen được tách dòng, đưa vào vector thích hợp để chuyển vào cây trồng ngày một nhiều và sản phẩm của quá trình chuyển gen là hàng loạt cây trồng mang những tính trạng mong muốn. Đến nay, lĩnh vực tạo giống cây trồng nông nghiệp GM đã phát triển vượt bậc và được ứng dụng mạnh mẽ nhất. Hàng năm, nhiều triệu ha diện tích đất canh tác đã được gieo trồng đại trà cây trồng GM. Năm 2001, 99% diện tích đất canh tác cây trồng GM trên toàn cầu tập trung ở 4 quốc gia: Hoa Kỳ (68%), Argentina (22%), Canada (6%) và Trung Quốc (3%) (James, 2001). Tới 46% của tổng diện tích đất canh tác đậu tương trên thế giới (72 triệu ha) đã gieo trồng các giống đậu tương GM. Đối với ngô, 14% trên tổng số 140 triệu ha diện tích đất trồng ngô đã sử dụng các giống ngô GM. Con số này là 20% trên tổng số 34 triệu ha ở bông và 11% trên tổng số 25 triệu ha ở cây cải

dầu (James, 2002). Cũng trong năm 2001, tổng diện tích đất canh tác các giống cây trồng GM trên toàn cầu là 52,6 triệu ha chủ yếu ở 16 quốc gia với sự tham gia của 5 triệu nông dân. Trong đó, Hoa Kỳ có 35,7 triệu ha; Canada có 3,2 triệu ha; Argentina có 11,8 triệu ha và ít nhất là 1,5 triệu ha ở Trung Quốc (James, 2002). Như vậy, một phần tư diện tích đất canh tác các cây trồng GM trên thế giới thuộc quốc gia đang phát triển, chủ yếu là Argentina và Trung Quốc. Đến năm 2003, tổng diện tích đất canh tác cây trồng GM trên thế giới là 67,7 triệu ha, tập trung ở 18 quốc gia và có sự tham gia của 7 triệu nông dân (James, 2003) (Bảng 1). Năm 2003 cũng là năm đánh dấu hai quốc gia mới là Brazil và Philippines lần đầu tiên phê chuẩn cho phép trồng cây GM. Theo dự đoán của các chuyên gia, những con số này đã và đang tiếp tục tăng lên nhanh chóng.

Bảng 1. Diện tích đất canh tác các giống cây trồng GM trên toàn cầu 2002 - 2003: theo quốc gia (triệu ha) (James, 2003)

Quốc gia	2002	%	2003	%	+/-	%
Hoa Kỳ*	39,0	66	42,8	63	+ 3,8	+ 10
Argentina*	13,5	23	13,9	21	+ 0,4	+ 3
Canada*	3,5	6	4,4	6	+ 0,9	+ 26
Brazil*	---	---	3,0	4	+ 3,0	---
Trung Quốc*	2,1	4	2,8	4	+ 0,7	+ 33
Nam Phi*	0,3	1	0,4	1	+ 0,1	+ 33
Australia*	0,1	< 1	0,1	< 1	---	---
Ấn Độ*	< 0,1	< 1	0,1	< 1	+ 0,05	+ 100
Romania*	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Uruguay*	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Tây Ban Nha	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Mexico	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Philippines	---	---	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Colombia	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Bulgaria	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Honduras	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Đức	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Indonesia	< 0,1	< 1	< 0,1	< 1	< 0,1	---
Tổng	58,7	100	67,7	100	+ 9,0	+ 15%

*: Quốc gia canh tác trên 500000 ha cây trồng GM trong năm 2003

Trong hai tính trạng được sử dụng phổ biến hiện nay thì các cây trồng kháng thuốc diệt cỏ được canh tác trên 7% toàn khu vực, cây trồng có khả năng sản sinh độc tố Cry là 15% và cây trồng mang cả hai tính trạng này có mặt trên 8% (Hình 2 và Hình 3). Hầu hết, sản phẩm sau thu hoạch được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi. Ngoài ra, rất nhiều tính trạng khác cũng được chuyển vào cây trồng nông nghiệp.

Tuy nhiên, các giống GM này mới được trồng ở quy mô nhỏ hoặc chưa được thương mại hóa như đủ để có khả năng kháng lại virus gây bệnh đốm vòng (ringspot virus) (Gonsalves, 1998) (Hình 4); lúa chuyển gen nhờ công nghệ sinh học hiện đại có thể kháng lại virus gây bệnh đốm vằn (Pinto *et al.*, 1999); chuối có thể sản xuất vaccine, lúa vàng (*GoldenRice*TM) sản xuất β -caroten, dẫn xuất của tiền vitamin A...



Hình 3: Giống lúa trong ruộng giống lúa MH63 chuyển gen *cry* kháng sâu đục thân
(Nguồn: Viện Nghiên cứu Lúa quốc tế - IRRI)

Năm 1994 là năm đánh dấu cây trồng GM đầu tiên (cà chua Flav'r Sav'r) có mặt trên thị trường tiêu phẩm Hoa Kỳ (Chrispeels, Sadava, 1992). Từ đó đến nay, số lượng và chủng loại cây trồng GM đã tăng lên đáng kể. Danh sách các sinh vật GM được đưa ra thị trường làm thực phẩm ngày càng phong phú (Gelvin, 1996). Theo số liệu đến tháng 10

năm 2002, ở Hoa Kỳ có tới 55 giống cây trồng này được cấp phép (từ 13 loài khác nhau) (Food and Drug Administration/Center for food safety & applied nutrition/Office of food additive safety, 2002). Ở Nhật Bản, đến ngày 3 tháng 3 năm 2004, có 57 giống cây trồng thuộc 6 loài khác nhau bao gồm khoai tây, đậu tương, mía, ngô, cải dầu, bông với những đặc tính

mối như có khả năng kháng côn trùng, thuốc diệt cỏ, tăng sản lượng... đã được Bộ Y tế, Lao động và Phúc lợi xã hội đánh giá an toàn (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare/Department of food safety, 2002). Các con số tương tự là 12 giống (5 loài khác nhau) ở Australia và New Zealand và 4 giống (3 loài khác nhau) ở Nam Phi (Food standards Australia New Zealand/Te mana kouniga kai - Ahitereiria ne aotearoa, 2002; South Africa National Department of Agriculture, 2002). Ở Liên minh châu Âu (European Union - EU), đến tháng 7 năm 2003, có 15 giống (4 loài khác nhau) được phê chuẩn sử dụng làm thực phẩm và có 10 hồ sơ đăng ký xin cấp phép đang ở các giai đoạn khác nhau của thủ tục phê chuẩn (Belgian Biosafety Server, 2001). EU được xem là khu vực rất chậm chạp trong việc quyết định sử dụng trên diện rộng công nghệ GM với nguyên tắc phòng ngừa được coi là cơ sở hành động (Chrispeels, Sadava, 2002). Đáng chú ý là ngày 9 tháng 3 năm 2004 vừa qua, chính phủ Anh thuộc EU, cuối cùng đã quyết định cho phép trồng đại trà một giống ngô GM có khả năng kháng thuốc diệt cỏ sau 5 năm tranh luận căng thẳng. Ngay cả chính phủ Đức, vốn có lập trường chống thực phẩm GM nhất cũng đã xây dựng một dự thảo luật trong đó đưa ra các điều kiện có thể cho phép canh tác cây trồng GM. Sự xuất hiện các cây trồng GM ở Đức chỉ còn là vấn đề thời gian (<http://www.bbc.co.uk>; <http://www.isaaa.org>).

Nhìn chung, hiện nay thương mại hóa các sinh vật GM trong nông nghiệp tập trung chủ yếu vào các giống khác nhau của bốn loài cây trồng chính: Đậu tương, ngô, cải dầu và bông (James, 2002). Trong khi chỉ một số ít sinh vật GM được sử dụng trực tiếp làm thực phẩm, các sản phẩm từ sinh vật GM đã phê chuẩn như bột ngô GM, dầu chiết từ hạt đậu tương và cải dầu GM thường được dùng trong các quá trình sản xuất thực

phẩm chế biến sẵn và được trộn với các sản phẩm không biến đổi di truyền.



Hình 4. Đậu tương biến đổi di truyền có khả năng kháng virus gây bệnh đốm vòng (Nguồn: USDA)

Cần nhấn mạnh rằng, không chỉ các quốc gia đang phát triển, các quốc gia châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Thailand, Hàn Quốc, Philippines... cũng đang nhập cuộc với rất nhiều nghiên cứu triển khai và bước đầu sản xuất thương mại các giống cây trồng GM. Ở Trung Quốc, theo số liệu thống kê năm 1996, 47 giống cây trồng GM được tạo ra sử dụng 103 gen có giá trị. Bộ Nông nghiệp cho biết, năm 1997 có 55 đăng ký thử nghiệm, giải phóng vào môi trường và thương mại cây trồng GM. Số hồ sơ đăng ký tăng lên 68 vào năm 1998, 72 vào năm 1999 và đến năm 2000, 6 giống cây trồng GM đã được trồng đại trà. Diện tích canh tác bông GM cũng tăng đáng kể: Từ 10000 ha (năm 1998) lên 140000 ha (năm 1999) và 340 ha (năm 2000) (Changyong, 2002). Từ năm 1996 đến năm 2000, cơ quan quản lý an toàn các sinh vật GM đã phê chuẩn 251 trên tổng số 353 hồ sơ đăng ký. Hiện nay, chương trình chuyển giao bông Bt đến người nông dân Trung Quốc là chương trình chuyển giao cây trồng GM lớn nhất thế giới (Huang *et al.*, 2002).

Ngoài ra, 4 quốc gia thuộc Hiệp hội các Quốc gia Đông Nam Á (ASEAN) là Indonesia, Malaysia, Philippines và Thailand đã thử nghiệm đồng ruộng thành công cây trồng GM. Indonesia là quốc gia duy nhất đã cho phép thương mại bông chuyển gen *cry*. Tuy nhiên, việc chấp nhận này kèm theo một số yêu cầu nhất định như khu vực trồng bông chỉ giới hạn ở 7 huyện của tỉnh South Sulawesi, hạt bông phải xuất khẩu và những phần còn lại của cây bông phải tiêu hủy. Hơn nữa, hàng năm cần phải xem xét đánh giá lại trước khi cho phép sản xuất vào năm sau. Indonesia cũng đã thử nghiệm đồng ruộng đậu tương và ngô, hai sản phẩm có tiềm năng thương mại tiếp theo (Manway, Subagyo, 2002). Thailand đã tiến

hành thử nghiệm đồng ruộng quy mô lớn trước khi thương mại bông chuyển gen *cry* và ngô kháng thuốc diệt cỏ. Khoảng 17 giống cây trồng/nguyên liệu GM đang được đánh giá rủi ro, bao gồm cả chua chín chậm, đu đủ kháng virus gây bệnh đốm vòng, bông kháng côn trùng, lúa và ngô kháng côn trùng và thuốc diệt cỏ. Đối với Malaysia, đậu tương là giống cây GM được trồng thử nghiệm đầu tiên. Trong trường hợp Philippines, các chương trình nghiên cứu về công nghệ sinh học thực vật đang triển khai tập trung vào thử nghiệm giống chuối kháng virus, đu đủ kháng virus gây bệnh đốm vòng, đu đủ và xoài chín chậm, ngô kháng côn trùng, dừa có hàm lượng lauric acid cao (<http://www.isaaa.org>)...

Bảng 2. Các cây trồng GM (thương mại và thử nghiệm) ở Trung Quốc, 1999
(Huang *et al.*, 2002)

STT	Cây trồng	Đặc tính mới
1	Bông	Kháng côn trùng*, kháng bệnh
2	Lúa	Kháng côn trùng*, kháng bệnh, kháng thuốc diệt cỏ, chịu mặn
3	Lúa mì	Kháng virus BYDV (barley yellow dwarf virus), tăng chất lượng
4	Ngô	Kháng côn trùng (<i>Bt</i>), tăng chất lượng
5	Đậu tương	Kháng thuốc diệt cỏ
6	Khoai tây	Kháng bệnh, tăng chất lượng
7	Nho	Kháng bệnh
8	Hạt dẻ	Kháng virus
9	Thuốc lá	Kháng côn trùng
10	Cải bắp	Kháng virus
11	Cà chua	Kháng virus*, chịu lạnh*
12	Dưa hấu	Kháng virus
13	Ớt ngọt	Kháng virus*
14	Ớt	Kháng virus
15	Thuốc lá cảnh	Đổi màu*
16	Đu đủ	Kháng virus

*: Đã được cấp phép thương mại, còn lại: Chờ thương mại hoặc giải phóng vào môi trường

Riêng trong lĩnh vực cây trồng GM phục vụ lâm nghiệp, các công ty công nghệ sinh học đã và đang hợp tác với những đối tác chính thuộc khối trồng rừng công nghiệp để hỗ trợ các nghiên cứu tăng tốc độ sinh trưởng của cây trồng, biến đổi cấu trúc gỗ, thay đổi chu kỳ tái sinh, tăng tính kháng đối với một số chất diệt cỏ nhất định... Trong khi các nghiên cứu sinh học liên quan đến cây lâm nghiệp còn khá mới mẻ so với cây nông nghiệp, trên toàn cầu số lượng các thử nghiệm đồng ruộng của cây lâm nghiệp GM cũng tăng khá nhanh. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, từ năm 1988 đến nay, trên toàn cầu có 194 thử nghiệm đồng ruộng các cây lâm nghiệp GM. Các thử nghiệm chủ yếu tập trung trên đối tượng là cây dương - nguyên liệu sản xuất giấy. Hoa Kỳ là quốc gia có số lượng các thử nghiệm đồng ruộng đối với cây lâm nghiệp GM nhiều nhất, chiếm 74% tổng các thử nghiệm toàn cầu (Asante-Owusu, 1999).

Ngoài các lợi ích như giảm chi phí sản xuất, cải thiện môi trường và sức khỏe con người, các cây trồng GM đã đem lại những lợi ích kinh tế to lớn. Dựa trên giá bán hạt giống và chi phí đầu tư cho công nghệ áp dụng, giá trị của thị trường hạt giống GM năm 2001 đạt tới 3,8 tỷ USD. Con số này là 3 tỷ USD vào năm 2000 (James, 2002). Hiện nay, các công ty khoa học sự sống ở nhiều quốc gia phát triển như Monsanto, Dow AgroSciences, Dupont/Pioneer, Syngenta, Bayer CropScience... đã và đang thống trị các ứng dụng công nghệ GM trong nông nghiệp. Một số công ty đang nỗ lực hỗ trợ và chuyển giao các công nghệ này cho những quốc gia đang phát triển (<http://www.isaaa.org>; Herrera-Estrella, 2000).

HIỆN TRẠNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN Ở VIỆT NAM

Ở nước ta, công nghệ sinh học được xem

là ngành quan trọng. Nghị quyết số 18/CP của Chính phủ ngày 11 tháng 3 năm 1994 chỉ rõ: "...Cùng với các ngành công nghệ mũi nhọn khác (công nghệ thông tin và công nghệ vật liệu mới), công nghệ sinh học sẽ góp phần khai thác tối ưu các nguồn lực của đất nước phục vụ phát triển sản xuất, nâng cao chất lượng cuộc sống của nhân dân và chuẩn bị những tiền đề cần thiết về mặt công nghệ cho đất nước tiến vào thế kỷ 21...". Từ năm 1994 đến nay, nhờ các biện pháp và chính sách khuyến khích, đầu tư hiệu quả, công nghệ sinh học ở nước ta ngày càng phát triển mạnh mẽ (Nguyễn Văn Bộ, 2001). Từ năm 1990, Chương trình Công nghệ Sinh học quốc gia đã được cấp kinh phí cho các dự án nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học, đặc biệt trong cải tiến giống cây trồng và kể từ năm 1995 cho các dự án nghiên cứu về việc phát triển công nghệ GM (Lê Trần Bình, 1998). Từ năm 2001, Chính phủ đã đầu tư 3 dự án/dề tài nghiên cứu sinh vật GM. Những dự án/dề tài này liên quan đến nhiều cây trồng quan trọng của Việt Nam. Bên cạnh đó, một số phòng thí nghiệm công nghệ sinh học đã và đang được nhà nước đầu tư trang thiết bị hiện đại và triển khai các kỹ thuật cơ bản của công nghệ gen như phân lập và xác định trình tự gen, thiết kế và biến nạp gen vào tế bào vi sinh vật, động vật, thực vật, nghiên cứu biểu hiện gen...

Trong các lĩnh vực nghiên cứu tạo sinh vật GM, nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu, ứng dụng với sự chú trọng đặc biệt. Nhiều gen quý có giá trị ứng dụng như năng suất, chất lượng, chống chịu đã được phân lập và nghiên cứu nhằm chuyển vào cây trồng để tạo nên những giống lý tưởng. Những vấn đề thiết kế vector cũng như hoàn thiện các quy trình tái sinh cây khởi đầu cho nghiên cứu chuyển gen cũng nhận được sự quan tâm của nhiều nhóm tác giả. Một số công trình nghiên cứu chuyển

gen chọn lọc và sàng lọc như gen kháng kanamycin, hygromycin, gen mã hóa β -glucuronidase (*gus*) vào thuốc lá, lúa... đã được tiến hành nhằm mục đích hoàn thiện các quy trình chuyển gen vào một số cây trồng quan trọng làm cơ sở cho các bước chuyển gen có giá trị vào các đối tượng cây trồng này. Nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau như phương pháp bắn gen, phương pháp sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*... đã được áp dụng thành công trên hàng loạt đối tượng cây trồng quan trọng như lúa, cà chua, cà tím, đậu xanh, cà phê, thuốc lá, khoai lang. Các nghiên cứu liên quan đến cây trồng GM tập trung tại Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (trước đây là Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia) và Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Trong đó, tại Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, các nghiên cứu cây trồng GM chủ yếu được tiến hành ở các phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học và Viện Sinh học Nhiệt đới. Tại Viện Công nghệ Sinh học, hướng nghiên cứu các giống cây trồng GM đã được đẩy mạnh ngay từ cuối những năm 1990. Các cán bộ của Viện đã tiến hành thu thập và phân lập được nhiều nguồn gen quý có giá trị nông nghiệp như gen chịu hạn, lạnh ở lúa gạo, gen sản xuất hormone protein bất hoạt hóa ribonuclease (RIP) ở cây mướp đắng và gen mã hóa α -amylase của cây đậu cô ve có hoạt tính diệt côn trùng; gen kháng bộ hạ khoai lang của vi khuẩn *Bt*; gen mã hóa protein vỏ của virus gây bệnh đốm vòng ở cây đu đủ... (Lê Trần Bình *et al.*, 1998; Lê Trần Bình, Lê Thị Minh, 1998; Lê Thị Đại Nhân *et al.*, 1999; Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 1999; Nguyễn Thúy Hà *et al.*, 1999; Nguyễn Hoàng Nam *et al.*, 1999; Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2000). Các gen này đã được chuyển vào cây trồng làm nguyên liệu để chuyển gen (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2000a, 2000b). Viện cũng tiến hành các nghiên cứu hoàn thiện những phương pháp chuyển gen vào một số đối

tượng cây trồng quan trọng (Đinh Thị Phòng *et al.*, 1995; Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, 1997; Hoàng Kim Oanh *et al.*, 1997, 1998; Phạm Bích Ngọc *et al.*, 2002; Trương Thu Thủy *et al.*, 2003). Đặc biệt, trong chương trình CNSH KHCN-02 giai đoạn 1996 - 2000, Viện đã thực hiện đề tài Công nghệ chuyển gen ở cây trồng, trong đó gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn ở lúa gây ra và gen *cry* đã được chuyển vào lúa. Hiện nay, trong Chương trình Khoa học Công nghệ Nhà nước KC-04, Viện Công nghệ Sinh học đang phối hợp cùng một số Viện nghiên cứu sinh học khác tại Việt Nam tiến hành đề tài KC04-13: chuyển gen vào cây hoa, cây bóng và cây lâm nghiệp, nhằm nâng cao sức chống chịu với sâu bệnh và điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Ngoài ra, trong khuôn khổ các đề án hợp tác trong nước và quốc tế, những vấn đề nghiên cứu tăng cường tính chịu hạn và chịu mặn ở cây lúa bằng công nghệ GM, chuyển gen kháng virus đốm vòng vào cây đu đủ, chuyển gen *cry* và gen chịu hạn vào cây bông... đã và đang được triển khai hiệu quả với một số loài cây GM trồng thử nghiệm ở nhà kính (Lê Trần Bình, 2002) (Hình 5).

Tại Viện Sinh học Nhiệt đới, sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* hoặc phương pháp bắn gen, các nhà khoa học đã tạo được các cây thuốc lá, lúa, đậu xanh, cải bông, cải xanh và cây cà tím GM mang gen *cry* kháng côn trùng, gen kháng thuốc diệt cỏ (Nguyễn Thị Liên Chi *et al.*, 1994; Nguyễn Hữu Tâm *et al.*, 1998; Mai Trường *et al.*, 1998; Nguyễn Hữu Hồ *et al.*, 1999; Nguyễn Thị Thanh *et al.*, 1998, 1999)... Hiện nay, Viện đang thực hiện việc chuyển gen vào cây thân gỗ như cây hồng sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105 chứa Ti-plasmid ITB mang gen *cry* kháng côn trùng, gen *bar* kháng thuốc diệt cỏ và gen chỉ thị *gus* (Lê Tấn Đức *et al.*, 2003; Nguyễn Văn Uyển *et al.*, 2003).



A



B



C

Hình 5. Nghiên cứu tạo du đủ biến đổi di truyền kháng virus gây bệnh đốm vòng tại Viện Công nghệ Sinh học

A: Cụm phôi du đủ được nhiễm *Agrobacterium*

B: Tái sinh chồi và rễ

C: Trồng và thử tính kháng virus

Tại Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Lã Tuấn Nghĩa và cộng sự (1995) đã chuyển gen *gus* và gen kháng kanamycin vào cà chua... Phan Tố Phương và cộng sự (1994) đã thành công trong việc sử dụng phương pháp gián tiếp qua vi khuẩn đất *A. tumefaciens* để chuyển gen vào cây *Arabidopsis*. Cũng chính nhóm tác giả này, năm 1998 đã công bố kết quả chuyển gen *Xa21* vào giống lúa Việt Nam sử dụng súng bắn gen (Phan Tố Phương *et al.*, 1998). Gần đây, nhóm nghiên cứu của Đặng Trọng Lương đã tiến hành thiết kế vector và chuyển gen *cry* vào cây cải bắp (Đặng Trọng Lương *et al.*, 2001a; 2001b). Các nghiên cứu chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ và kháng bệnh khô vằn vào giống lúa DT10, DT13; gen kháng bệnh bạc lá vào giống lúa VL902; gen kháng sâu tơ vào cải

bắp CB26; gen *cry*, *gna*, *Xa21* và gen mã hóa β -caroten vào lúa Indica... đã và đang được triển khai với những kết quả khả quan (Báo cáo Hội nghị Toàn quốc Đánh giá tình hình thực hiện Nghị quyết 18/CP của Chính phủ và kế hoạch phát triển Công nghệ sinh học đến năm 2010, Hà Nội 2003). Ngoài ra, hướng thiết kế và sử dụng vector không chứa gen kháng kháng sinh làm chỉ thị chọn lọc, mặc dù rất mới, cũng đang được tiếp cận nghiên cứu ở nước ta.

Kết quả của những nghiên cứu trên là những cây chuyển gen đã được tạo ra và lưu giữ trong điều kiện phòng thí nghiệm và trong điều kiện nhà kính. Tuy nhiên, những cây trồng này mới chỉ tồn tại ở quy mô thí nghiệm và chờ thử nghiệm. Hiện nay, chúng ta chưa có quy chế cho việc tiến hành thử

thực nghiệm này trong này ở ngoài đồng ruộng.

Trong tương lai, cây trồng GM được nghiên cứu trên đất trồng nước đang chờ thử nghiệm, một số cây trồng du nhập vào nước ta có thể là sản phẩm của công nghệ GM (Sinh vật chuyển gen, 2000). Hiện nay, chưa có cơ quan nào thống kê, đánh giá đầy đủ tình trạng nhập khẩu các sinh vật GM và sản phẩm của chúng để sử dụng trong nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, dược phẩm. Do chúng ta chưa có văn bản pháp lý để quản lý thống nhất trên cả nước nên các hoạt động nghiên cứu, ứng dụng, bảo quản, sản xuất, xuất nhập khẩu, vận chuyển sinh vật GM nói chung và cây trồng GM nói riêng chưa quản lý hay giám sát được.

CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN: NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN TRANH LUẬN

Biến đổi di truyền chỉ là một trong các kỹ thuật của công nghệ sinh học hiện đại. Vì vậy, câu nhac mạt rùng trong khi biến đổi di truyền và sản phẩm của chúng là vấn đề gây tranh cãi, các kỹ thuật khác của công nghệ sinh học hiện đại không hề liên quan đến vấn đề tranh luận này.

Cây trồng GM có thể góp phần không nhỏ trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất và đáp ứng nhu cầu của đời sống xã hội. Cây trồng GM tạo ra từ công nghệ này với những tính năng ưu việt đã đem lại rất nhiều lợi ích cho sản xuất nông nghiệp, những tiềm năng phát triển từ lợi ích này cũng cho thấy GM có thể đem lại những lợi ích cho công nghệ GM này cũng như tạo ra một số thách thức về những lợi ích và rủi ro đối với con người và môi trường sống. Những vấn đề kinh tế - xã hội liên quan đến lợi ích và rủi ro về kỹ thuật biến đổi di truyền, thường xoay quanh những vấn đề về lợi ích do chúng đem lại.

Trong ý kiến đóng góp cho rằng việc ứng

dụng kỹ thuật GM để tạo ra các sinh vật GM nói chung và cây trồng GM nói riêng có thể góp phần: (1) cung cấp nguồn lương thực cần thiết trong tương lai; (2) tăng cường chất lượng thực phẩm; (3) loại trừ thực phẩm có mang các chất độc hoặc các chất gây dị ứng; (4) tạo ra cây trồng sản sinh năng lượng, sau đó nuôi cấy thu sinh khối để chuyển thành năng lượng và nhiên liệu sinh học (biodiesel và bioethanol) có thể thay thế được các nhiên liệu hóa thạch và dầu khoáng; (5) sản xuất nhiều loại hóa chất, trong đó chủ yếu là các loại dầu chiết từ hạt lanh, cải dầu và hướng dương; (6) tạo ra các chất hóa học đặc biệt như các dược phẩm, mỹ phẩm và thuốc nhuộm; (7) sản xuất các hợp chất sinh học đặc biệt như sợi sinh học tổng hợp (chủ yếu bắt nguồn từ sợi gai dầu và sợi lanh); keo lignocellulose, các chất tán sắc, phân bón và phụ gia; nhựa sinh học...; (8) tăng khả năng chăm sóc sức khỏe; (9) sản xuất dược phẩm chống các căn bệnh đặc biệt; (10) tạo các chất hóa học ít gây ô nhiễm môi trường và dễ kiểm soát; (11) làm thay đổi lợi nhuận từ các hoạt động nông và công nghiệp, giảm bớt sự ô nhiễm môi trường; (12) đem lại những lợi ích đáng kể cho môi trường, trong đó tạo ra các khả năng mới trong việc giám sát và quản lý ảnh hưởng môi trường (The Royal Society, 1999; Alves *et al.*, 1999; Chrispeels, Sadava, 2002; Herrera-Estrella, 2000; Mackenzie *et al.*, 2003; Qaim, Zilberman, 2003).

Tuy nhiên, các ý kiến ngược lại cho rằng: (1) Công nghệ GM đã vượt qua những điều con người lẽ ra không nên làm; (2) hiện nay, có rất ít bằng chứng khẳng định sản lượng nông nghiệp đã tăng lên; (3) rất nhiều ví dụ về các ứng dụng GM đã bị thất bại do sự hạn chế vốn có của công nghệ và sự phức tạp trong giải quyết các vấn đề, ví dụ: Sản xuất lúa không gây dị ứng; (4) về khía cạnh y tế, không có đủ thông tin liên quan đến độc tố và chất gây dị ứng trong các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng

GM; (5) ảnh hưởng đối với môi trường khi đưa sinh vật GM ra môi trường, đặc biệt là những ảnh hưởng đối với đa dạng sinh học; (6) hoạt động nông và công nghiệp bị thay đổi theo chiều hướng bất lợi; (7) các ảnh hưởng kinh tế - xã hội cũng ở nguy cơ cao, ví dụ việc loại bỏ các cây trồng thu hoa lợi hoặc các cây trồng truyền thống và gây đình trệ hệ thống nông trại quy mô nhỏ đang thịnh hành ở các quốc gia đang phát triển; (8) một số công ty về công nghệ sinh học nông nghiệp, công ty giống có những hướng quản lý và sử dụng công nghệ khó chấp nhận; (9) việc đăng ký sáng chế đối với các sinh vật sống, gen và/hoặc các nguyên liệu di truyền cũng gây cản trở nghiên cứu, triển khai... đặc biệt là: Nông dân cần được giữ hạt giống của mùa vụ này cho mùa vụ gieo trồng sau; cần phải cấm việc quyền sở hữu trí tuệ bảo hộ gen hoặc các trình tự nucleic acid không thuộc các sáng chế thực sự (Sinh vật chuyển gen, 2000; Chrispeels, Sadava, 2002; Qaim, Zilberman, 2003).

Đối với bảo tồn đa dạng sinh học, việc ứng dụng công nghệ GM đã nảy ra rất nhiều mối quan tâm. Các ý kiến ủng hộ cho rằng, công nghệ mới này có thể đem lại những lợi ích cho đa dạng sinh học và môi trường, ví dụ, những tác động tích cực của công nghệ GM bao gồm: (1) Tăng hiệu quả nông nghiệp, giảm nhu cầu sử dụng đất canh tác và như vậy, có thể làm giảm áp lực chuyển đổi đất lâm nghiệp và các khu vực sinh thái đa dạng sinh học quan trọng khác thành đất nông nghiệp; (2) sử dụng các cây trồng có khả năng kháng sâu bệnh giúp giảm dùng thuốc trừ sâu hóa học; (3) sử dụng vi sinh vật trong các quy trình công nghiệp, ví dụ như trong lĩnh vực sản xuất nhiên liệu và nhựa có thể làm giảm lượng hóa chất cần sử dụng (Mackenzie *et al.*, 2003).

Tuy nhiên, cũng có một số lo ngại về ảnh hưởng của cây trồng GM đến đa dạng sinh học. Một số giả thuyết cho rằng giải phóng cây trồng GM ra môi trường có thể

phát sinh những loại rủi ro tương tự như những ảnh hưởng tìm thấy ở các loài sinh vật xâm lấn. Việc giải phóng có chủ định (ví dụ, trong các dự án thử nghiệm đồng ruộng hoặc trồng đại trà phục vụ mục đích thương mại cây trồng GM) đã đẩy lên các mối quan tâm về ảnh hưởng của cây trồng GM đối với đa dạng sinh học, trong đó bao gồm các nguy cơ: (1) Phát tán sinh vật ra môi trường - ví dụ, thông qua quá trình xâm lấn hoặc tăng cường khả năng cạnh tranh; (2) chuyển các nguyên liệu di truyền tái tổ hợp (và các đặc tính liên quan) vào các cơ thể sinh vật khác - ví dụ, thông qua thụ phấn chéo; (3) ảnh hưởng đến các loài sinh vật không cần diệt - ví dụ, một số nghiên cứu chỉ ra khả năng cây trồng GM với tính trạng kháng các loài côn trùng gây hại cũng có thể gây ảnh hưởng bất lợi đối với côn trùng có ích và chim; (4) ảnh hưởng đến vi khuẩn đất và chu trình nitơ; (5) ảnh hưởng gián tiếp đến môi trường - ví dụ, ảnh hưởng phát sinh do thay đổi cung cách quản lý nông nghiệp. Hơn nữa, các ảnh hưởng kinh tế - xã hội liên quan đến bảo tồn đa dạng sinh học cũng gây ra những mối lo ngại. Lối sống, nghề nghiệp, truyền thống văn hóa và cộng đồng địa phương, cộng đồng nông thôn và các vấn đề khác có thể bị ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp (Gasson, 2000; Chrispeels, Sadava, 2002; Monarch butterfly studies).

Trong nhiều trường hợp, các mối lo ngại trên đã được giải đáp nhờ những bằng chứng khoa học. Ví dụ, gen kháng kháng sinh *nptII* dùng trong chọn lọc các thể tái tổ hợp của Calgene đã được nghiên cứu chứng minh độ an toàn và được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (U.S Food and Drug Administration - FDA) chấp thuận (Gasson, 2000). Năm 1999, có một báo cáo về ảnh hưởng có hại của hạt phấn từ cây ngô GM mang gen *cry* đến ấu trùng của loài bướm Monarch. Báo cáo này đã gây ra mối quan tâm và lo ngại về những rủi ro mà thực vật mang gen *cry* có thể gây ra đối với sinh

vật không cần diệt. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy, giống ngô GM này gây ảnh hưởng không đáng kể đối với quần thể bướm Monarch trên cánh đồng. Nỗ lực nghiên cứu hợp tác giữa các nhà khoa học Hoa Kỳ và Canada đã cung cấp những thông tin để xây dựng quá trình đánh giá rủi ro tiêu chuẩn về ảnh hưởng của ngô GM đối với quần thể bướm Monarch. Các kết luận cho thấy rằng, hầu hết các giống lai thương mại, protein Cry được biểu hiện với nồng độ rất thấp trong hạt phấn và nghiên cứu trong phòng thí nghiệm cũng như trên đồng ruộng cho thấy mọi mật độ hạt phấn đều không gây ảnh hưởng có hại trên cánh đồng (Monarch butterfly studies <http://www.pnas.org/papbyrecent.shtml>). Ngoài ra, các nghiên cứu về nguy cơ chuyển các nguyên liệu di truyền tái tổ hợp từ cây trồng GM vào các cơ thể sinh vật khác cũng được triển khai. Hầu hết, nghiên cứu khẳng định các sự kiện như vậy rất hiếm xảy ra (Gasson, 2000; Chrispeels, Sadava, 2002). Tuy nhiên, những tranh cãi về việc sử dụng gen kháng kháng sinh làm chỉ thị chọn lọc đã tạo ra hướng nghiên cứu tìm kiếm chỉ thị chọn lọc thay thế như hệ thống *Crellox* cho phép loại bỏ các chỉ thị chọn lọc sau biến nạp vào tế bào thực vật (Lazzeri, 1998). Gần đây, Công ty Novartis công bố không sử dụng các gen kháng kháng sinh để chọn lọc các thể sau biến nạp. Hệ thống chỉ thị chọn lọc tích cực "Positech" của họ đã dựa trên gen mã hóa phosphomannose isomerase và chọn lọc các thể sau biến nạp nhờ khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa mannose (Anon, 2000). Ngoài ra, một hướng chiến lược khác cũng đang được sử dụng trong phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*, đó là hệ thống biến nạp đồng thời gen có giá trị và gen chọn lọc, sau đó, tiến hành tách riêng (Gasson, 2000).

Cuối cùng, các tranh luận trên đã dẫn đến rất nhiều cuộc thảo luận về mặt chính sách là làm sao quản lý việc ứng dụng công

nghệ GM ở cấp quốc gia. Vấn đề xây dựng khung quản lý sinh vật GM hoàn toàn không đơn giản và khó khăn chính là làm sao cân bằng giữa lợi ích to lớn công nghệ có thể đem lại và đảm bảo an toàn đối với môi trường cũng như sức khỏe con người. Những trở ngại này chỉ có thể được giải quyết với nỗ lực của mỗi quốc gia và sự hợp tác quốc tế hiệu quả (Kinderlerer, <http://www.unep.ch/biosafety/BTregulation-JK.pdf>).

QUẢN LÝ AN TOÀN CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN

Quy chế quản lý an toàn các sinh vật GM trong đó có cây trồng GM đã được triển khai từ giữa những năm 1980 ở các quốc gia phát triển. Trong khi đó, hầu hết quốc gia đang phát triển không có đủ năng lực khoa học cũng như năng lực thực thi để quản lý an toàn cây trồng GM. Để cân bằng và hỗ trợ, rất nhiều tổ chức phi chính phủ và tổ chức hợp tác song phương, đa phương đã và đang tham gia tư vấn xây dựng các quy chế thích hợp để quản lý an toàn sinh vật và sản phẩm GM, cũng như hỗ trợ kỹ thuật để thực thi chúng. Các tổ chức này cũng đặt vấn đề tạo sự thống nhất giữa các quy chế quốc gia (<http://www.isaaa.org>; Bijman, 1994).

Cần nhấn mạnh rằng, hiện nay các sinh vật và sản phẩm GM ngày càng có mặt trong nhiều loại thực phẩm. Tại Hoa Kỳ, quốc gia dẫn đầu trong thương mại các sản phẩm GM sử dụng cho người và động vật, tính từ năm 1995, khi thực phẩm GM đầu tiên có mặt trên thị trường, đến nay Hoa Kỳ đã phê chuẩn rất nhiều giống cây trồng GM làm thực phẩm như đậu tương, cải dầu, ngô, lúa, củ cải đường, rau húng kháng thuốc diệt cỏ; đu đủ, khoai tây và dưa hấu kháng virus; ngô, khoai tây, lúa, cà chua kháng côn trùng; cà chua, dưa đỏ mang gen làm chậm quá trình chín của quả... Tại Canada, chính phủ đã phê chuẩn 51 loại thực phẩm mới

dùng cho người, hầu hết trong số đó là các sản phẩm GM, bao gồm nhiều giống ngô, cải dầu, khoai tây, cà chua, chanh và củ cải đường. Việc sử dụng ngày càng rộng rãi các thực phẩm GM dẫn đến vấn đề quản lý an toàn các sản phẩm này đang được quan tâm đặc biệt. Thực trạng hiện nay đang hình thành nhiều quan điểm trái ngược nhau về vấn đề quản lý an toàn và dán nhãn chúng. Một số quốc gia yêu cầu bắt buộc dán nhãn các sản phẩm thực phẩm GM (Cộng đồng châu Âu, Brazil, Nhật Bản, Trung Quốc), trong khi một số quốc gia khác lại cho phép dán nhãn tự nguyện và không bắt buộc dán nhãn các sản phẩm này (Hoa Kỳ, Canada, Argentina). Cụ thể, Hoa Kỳ cho rằng các sản phẩm tạo ra từ công nghệ sinh học tương đương với các sản phẩm tạo ra nhờ các biện pháp truyền thống và không có bằng chứng khoa học nào cho thấy sản phẩm GM gây ra nhiều rủi ro hơn. Vì vậy, chính phủ nước này không yêu cầu dán nhãn các sản phẩm của công nghệ sinh học. Tuy nhiên, một số bang và thành phố triển khai nghiên cứu quy định để thực hiện dán nhãn các sản phẩm này (<http://www.dawnone.com/GMfoodq.htm>). Cũng như Hoa Kỳ, Canada không yêu cầu dán nhãn bắt buộc đối với các sản phẩm công nghệ sinh học và ủng hộ việc dán nhãn trong từng trường hợp cụ thể phù hợp với chính sách của Canada áp dụng cho tất cả các loại thực phẩm. Luật pháp Canada hiện nay cho phép ghi nhãn tự nguyện đối với sản phẩm công nghệ sinh học. Cuối năm 2001, cơ quan lập pháp của nước này đã bác bỏ một dự luật yêu cầu bắt buộc dán nhãn đối với sản phẩm công nghệ sinh học. Đối lập với nhóm các quốc gia trên, Cộng đồng châu Âu đã thực thi Hướng dẫn 90/220/EEC về an toàn môi trường và thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, hạt giống công nghệ sinh học (có hiệu lực từ tháng 10 năm 1991); Quy định thực phẩm mới đề cập đến vấn đề an toàn thực phẩm GM và dán nhãn (thông qua từ tháng 5 năm

1997) với yêu cầu dán nhãn tất cả thực phẩm có chứa sản phẩm GM hoặc được tạo ra từ công nghệ sinh học; Quy định 50/2000 về dán nhãn các chất phụ gia và tạo hương thực phẩm có thành phần công nghệ sinh học; Quy định 49/2000 về yêu cầu dán nhãn những trường hợp thực phẩm truyền thống nhiễm nguyên liệu công nghệ sinh học không chủ định (Stamps, 2002). Gần đây, Cộng đồng châu Âu đang xây dựng những quy tắc mới áp dụng cho việc dán nhãn các thực phẩm và thức ăn chăn nuôi với tổng lượng GM nhiễm tạp cho phép trong thực phẩm < 0,5% (Osborn, Vidal, 2002). “Quyền được biết” của người tiêu dùng có lẽ khuyến khích nhiều quốc gia ủng hộ hoặc thực thi luật dán nhãn thực phẩm GM (Skerrit, <http://binas.unido.org/binas/show.php?id=22&type=html&table=booksources&dir=reviews>).

Hiện nay, nhiều quốc gia đang nỗ lực cùng nhau nghiên cứu, triển khai và thương mại cây trồng GM cũng như thống nhất quản lý các sản phẩm này. Một số quốc gia châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ, Thailand, Malaysia, Philippines đang đầu tư rất lớn cho công nghệ sinh học hiện đại và quan tâm đến vấn đề quản lý các sản phẩm tạo ra từ ngành công nghệ cao này như xây dựng và thực thi hệ thống quy chế quản lý. Chẳng hạn, Trung Quốc đã thực thi một số quy chế quản lý các sinh vật GM ngay từ giữa những năm 1990. Ủy ban Khoa học và Công nghệ Quốc gia, cùng với sự hợp tác của Bộ Y tế, Bộ Nông nghiệp, Viện Hàn lâm Khoa học đã soạn thảo Quy chế quản lý an toàn sinh học kỹ thuật di truyền (Regulation on Biosafety Control of Genetic Engineering) nhằm xây dựng khung pháp lý về việc giải phóng các sinh vật GM vào môi trường. Sau những cuộc thảo luận rộng rãi, quy chế đã được thông qua và có hiệu lực từ năm 1993. Sau đó, Quy chế hướng dẫn quản lý an toàn kỹ thuật di truyền sinh học nông nghiệp (Safety Administration Implementation

Regulation on Agricultural Biological Genetic Engineering) của Bộ Nông nghiệp (1996), Quy chế hướng dẫn quản lý an toàn thuốc lá chuyển gen (Safety Administration Implementation Regulation on Tobacco Genetic Engineering) (1998) và Quy chế phê chuẩn sản phẩm sinh học mới (Regulation on Approval of New Biological Products) (1999) là những văn bản chính để quản lý các vấn đề nghiên cứu, phát triển, giải phóng vào môi trường và thương mại các sinh vật GM. Tuy nhiên, thực tế cho thấy hầu hết các sinh vật GM và sản phẩm của chúng là các giống cây trồng, vật nuôi nông nghiệp và dược phẩm nên năm 2001, Hội đồng quốc gia đã ban hành Quy chế Quản lý an toàn các sinh vật GM nông nghiệp. Quy chế này cũng bao gồm các điều khoản về nghiên cứu, thực nghiệm, sản xuất và chế biến, hoạt động xuất nhập khẩu, tư vấn và giám sát các sinh vật GM nông nghiệp (Changyong, 2002).

Trong khi đó, ở nước ta, trong điều kiện nền kinh tế còn phụ thuộc nhiều vào nông nghiệp, đang hướng vào hội nhập với thế giới, rất nhiều sản phẩm xuất - nhập khẩu và sản phẩm nghiên cứu, triển khai là sản phẩm tạo ra từ công nghệ sinh học hiện đại nên không thể đứng ngoài xu thế này. Việc nghiên cứu ứng dụng sinh vật GM nói chung và cây trồng GM nói riêng song song với quản lý và giám sát là nhiệm vụ hết sức cần thiết ở nước ta. Theo Nguyễn Văn Uyển (1997), tổ chức các cơ quan quản lý an toàn sinh vật GM là việc làm cấp bách do: (i) Chính phủ đã xác định công nghệ sinh học là ngành mũi nhọn. Công nghệ GM và các sản phẩm GM tạo ra nhờ công nghệ này là trung tâm của các hoạt động công nghệ sinh học; (ii) Khi thực hiện chính sách kinh tế mở, kinh tế toàn cầu, sự du nhập của các sinh vật GM ở các quy mô khác nhau vào sản xuất nông nghiệp, y tế, bảo vệ sức khỏe và bảo vệ môi trường là tất yếu, dù chúng ta muốn hay không. Chủ động nhất là phải

đánh giá và quản lý các nguy cơ rủi ro của sinh vật GM; (iii) Do công nghệ sinh học ở nước ta mới bắt đầu phát triển, công nghệ gen thực vật, động vật, vi sinh vật còn ở giai đoạn phôi thai, hiểu biết của quần chúng và người tiêu dùng về công nghệ gen còn rất hạn chế nên rất cần cung cấp đầy đủ thông tin về sinh vật GM cho cộng đồng.

Nhận thấy tầm quan trọng của việc xây dựng khung pháp lý để quản lý an toàn sinh vật GM. Gần đây, Bộ Tài nguyên và Môi trường, với sự hỗ trợ của các chuyên gia từ các bộ ngành liên quan trong cả nước, đã tiến hành soạn thảo Bản Dự thảo Quy chế Quản lý An toàn các Sinh vật đã biến đổi gen và Sản phẩm của chúng trên cơ sở Công ước quốc tế về Đa dạng sinh học (Convention on Biological Diversity), Nghị định thư Cartagena về An toàn sinh học (Cartagena Protocol on Biosafety), kinh nghiệm của các quốc gia tiên tiến trong lĩnh vực quản lý an toàn sinh học và các tổ chức quốc tế cũng như tham khảo tình hình thực tế và các nghị định, thông tư liên quan đến công nghệ sinh học của Việt Nam như Pháp lệnh Kiểm dịch thực vật, Luật Môi trường, Nghị quyết số 18/CP của Chính phủ... (<http://www.nea.gov.vn>).

Rõ ràng, công nghệ GM và cây trồng GM sẽ tiếp tục là lĩnh vực mũi nhọn trong thế kỷ 21. Việc sử dụng sinh vật GM và sản phẩm của chúng đã trở thành một vấn đề toàn cầu, gây ra một thách thức lớn đối với nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam. Trong xu thế toàn cầu hóa và sự phát triển nhanh chóng của công nghệ sinh học hiện đại, chúng ta không thể tách rời và đứng ngoài tiến trình lịch sử này. Việc chủ động tiếp cận và quản lý hợp lý công nghệ là biện pháp hữu hiệu nhằm nghiên cứu và sử dụng các sản phẩm GM hiệu quả và đảm bảo an toàn cho môi trường sinh thái cũng như sức khỏe con người. Đây mạnh đầu tư nghiên cứu chuyển gen, quản lý an toàn sản phẩm của công nghệ GM nhập khẩu cũng

như sản xuất trong nước như xây dựng các phòng kiểm nghiệm tiêu chuẩn để kiểm nghiệm (ở mức độ phân tử) và đánh giá độ an toàn của các sản phẩm thực phẩm GM trước khi đưa ra thị trường... trên cơ sở nghiên cứu, xây dựng và triển khai áp dụng những chiến lược thích hợp sẽ tạo đà cho sự phát triển công nghệ sinh học cũng như cây trồng và sản phẩm GM nhằm tăng cường lợi ích kinh tế của ngành khoa học mũi nhọn này ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adang MJ, Brody MS, Cardineau G, Eagan N, Roush RT, Shewmaker CK, Jones A, Oakes JV, McBride KE (1993) The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol Biol* 21: 1131-1145.
- Altosaar I, Sardana R, Dukjandjiev S, Giband M, Cheng X (1997) Synthetic *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin genes for insect resistance and their rapid bioassay using maize endosperm suspension cultures. *Rice genetics* III: 737-742.
- Alves AC, Quecini VM, Vieira MLC (1999) Plant transformation: Advances and perspectives. *Sci Agric* 56(1).
- Anon (2000) Novartis pins hopes for GM seeds on new marker system. *Nature* 406: 924.
- Asante-Owusu R (1999) GM technology in the forest sector. *WWF International Gland*.
- Báo cáo Hội nghị toàn quốc đánh giá tình hình thực hiện Nghị quyết 18/CP của Chính phủ và kế hoạch phát triển công nghệ sinh học đến năm 2010 (2003). *Bộ Khoa học và Công nghệ*, Hà Nội, 11/2003.
- Belgian Biosafety Server (2001) Novel food notifications pursuant to article 5 of regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. http://biosafety.ihe.be/NF/Gmfoods/Notifications_art5_258_97.html
- Bijman J (1994) Biosafety: regulation. *Biotechnol Develop Monitor* 18: 14-15.
- Bùi Chí Bửu (2002) Công nghệ sinh học trong nông nghiệp với các nước đang phát triển. *Tạp chí Hoạt động Khoa học* 11: 30-31.
- Changyong W (2002) Biosafety work in China: Risk assessment and risk management. *Asia Regional Workshop on Risk assessment in Implementing the Cartagena Protocol on Biosafety*. New Delhi, 22 - 24/5/2002: 104-114.
- Cheng X, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I (1998) *Agrobacterium* - transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2767-2772.
- Chrispeels MJ, Sadava DE (2002) *Plants, genes, and crop biotechnology*. Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts, USA.
- Đặng Trọng Lương, Nguyễn Đức Doanh, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng, Trần Duy Quý (2001a) Nghiên cứu chuyển gen *cryIA(c)* kháng sâu vào một số giống cải bắp (*Brassica oleracea* var *capitata*) qua *Agrobacterium*. *Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000 Viện Di truyền Nông nghiệp*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội: 120-128.
- Đặng Trọng Lương, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (2001b) Phân lập và thiết kế vectơ mang gen tổng hợp insulin để chuyển vào cây lúa mì. *Thông tin Công nghệ Sinh học Ứng dụng*: 36-41.
- Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1995) Kết quả chuyển gen ở giống lúa CR203 bằng súng bắn gen. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 54-59.
- Food and Drug Administration/Center for food safety & applied nutrition/Office of food additive safety (2002) List of completed consultations on bioengineered foods. <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html#list> U.S.
- Food standards Australia New Zealand/Te mana kouniga kai - Ahitereiria ne aotearoa (2002) Genetically modified or GM foods - Current applications and approvals. <http://www.food-standards.gov.au/whatinfood/gmfoods/gmcurrentapplication1030.cfm>
- Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002) *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129: 13-22.
- Gasson MJ (2000) Gene transfer from genetically modified food. *Curr Opin Biotechnol* 11: 505-508.
- Gelvin SB (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol* 9: 227-232.
- Gonsalves D (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annu Rev Phytopathol* 36: 415-437.

- Goodman LM, Hauptli H, Crossway A, Knauf VC (1987) Gene transfer in crop improvement. *Science* 236: 48-54.
- Gordon JW, Russell H, H (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Nature* 214: 1244-1246.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad JRC (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683.
- Herrera-Estrella LR (2000) Genetically modified crops and developing countries. *Plant Physiol* 124: 923-925.
- Hoàng Kim Oanh, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình (1997) Nghiên cứu chuyển gen ở lúa bằng sử dụng súng bắn gen CORB-103. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng* 3: 40-42.
- Hoàng Kim Oanh, Lê Văn Sơn, Lâm Đại Nhân, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (1998) Kết quả nghiên cứu tạo cây chuyển gen. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Horsch RB, Fraley RC, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A, Jefferson N (1984), Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223: 496-498.
- <http://www.bbi.co.uk>
- <http://www.danone.com/GMfoodq.htm>
- <http://www.fao.org>
- <http://www.ipsa.org.cn>
- Huang J, Rozelle S, Pray C, Wang Q (2002) Plant biotechnology in China. *Science* 295: 674-677.
- <http://www.biotec.org.cn>
- Ishida Y, Hiei Y, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14: 745-750.
- James CL (1997) Global status of transgenic crops in 1997. *ISAAA Briefs* 5: 1-27.
- James CL (1998) Global review of commercialized transgenic crops: 2001. *ISAAA Briefs* 24.
- James CL (2002) Global review of commercialized transgenic crops: 2001. *ISAAA Briefs* 26.
- James CL (2003) Global status of commercialized transgenic crops: 2003. *ISAAA Briefs* 30.
- Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (2002) Food safety (2002) List of the products whose safety assessments were completed by the Ministry of Health, Labour and Welfare. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/>
- Kinderlerer J Regulation of Biotechnology: Needs and burdens for developing countries. <http://www.unep.ch/biosafety/BTregulationJK.pdf>
- Lazzeri PA (1998) Techniques for the development of transgenic crops in crop protection. *BCPC Symp Proc* 71: *Biotechnology in crop protection: Facts and fallacies*: 3-9.
- Lã Tuấn Nghĩa, Trần Lan Hương, Nguyễn Đức Doanh, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (1995) Bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào cà chua qua *Agrobacterium*. *Hội thảo Quốc gia và Khu vực nhân năm Louis Pasteur*: 327-332.
- Lâm Đại Nhân, Lê Trần Bình, Hassan MD (1999) Tách dòng và thiết kế chuyển gen của gen mã hóa protein vỏ (gen CP) từ virus gây bệnh đốm vòng cây đu đủ (PSRV) ở Việt Nam. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*: 200-216.
- Lê Tấn Đức, Sudhakar D, Jefferson R, Christou P (1998) Một hệ thống chuyển gen cho cây lúa sử dụng mô sẹo của hạt lúa chín và súng bắn gen đơn giản. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyên (2003) Tạo cây Hồng (*Paulownia fortune*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003*: 1088-1090.
- Lê Thị Thu Hiền, Đào Thị Hồng Vân, Đặng Thị Thu, Nông Văn Hải (1999) Phân lập gen mã hóa lectin và protein kim hãm alpha-amylase ở hạt đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*). *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*: 116-120.
- Lê Thị Thu Hiền, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải (2002a) Thiết kế vectơ mang gen độc tố cryIA(c) dưới sự điều khiển của đoạn khởi động của gen tổng hợp đường (Rsucl promoter) phân lập từ giống lúa C71. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 40(ĐB): 135-141.
- Lê Thị Thu Hiền, Trịnh Công Sự, Trần Thị Phương Liên, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2002b) Thiết kế vectơ và biểu hiện gen mã hóa protein độc tố cryIA(c) có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bằng vi khuẩn *Escherichia coli*. *Tạp chí Sinh học* 24(3): 39-46.
- Lê Trần Bình (1998) Tình hình phát triển công nghệ chuyển gen ở cây trồng trên toàn cầu và ở Việt Nam. *Tin tức hoạt động Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia* 11: 8-9.

- Lê Trần Bình (2002) Báo cáo tổng kết công tác năm 2001. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 2000 - 2001*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 20-30.
- Lê Trần Bình, Kiyoharu Oono, Rodriguez RL (1998) Phân lập gen liên quan đến tính chịu lạnh ở cây lúa. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998) *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội.
- Mackenzie R, Burhenne-Guilmin F, La Vina AGM, Werksman JD (2003) An explanatory guide to the Cartagena Protocol on Biosafety. IUCN Environmental Policy and Law Paper N°-46.
- Mai Trường, Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Uyên (1998) Bước đầu chuyển gen *bar*, gen *gusA* và gen *cryIA(c)* vào cây đậu xanh (*Vigna radiata* L.) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Manway I, Subagyo T (2002) Transgenic cotton in Indonesia: Challenges and opportunities. Regional Workshop for ISAAA BICs Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, July, 2002: 30-31
- Monarch butterfly studies. <http://www.pnas.org/papbvrecent.shtml>
- Nap JP, Metz PJ, Escaler M, Conner AJ (2003) The release of genetically modified crops into the environment. *Plant J* 33: 1-18.
- Nghị quyết số 18/CP ngày 11/3/1994 của Chính phủ về phát triển công nghệ sinh học ở Việt Nam đến năm 2010.
- Nguyễn Trung Nam, Vũ Đình Hòa, Đinh Sơn Quang, Nguyễn Thị Bích Thủy, Võ Thị Thứ (2002) Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ cho việc phân lập gen kháng bọt Hà ở khoai lang. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 2000 - 2001*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 206-217.
- Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Uyên (1999) Tạo cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) kháng thuốc trừ cỏ basta bằng chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 1297-1304.
- Nguyễn Hữu Tâm, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Uyên (1998) Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để chuyển gen kháng hygromycin và gen *gusA* vào lúa indica (*Oryza sativa* L.). *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Nguyễn Thị Liên Chi, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyên (1994) Chuyển gen kháng kanamycin vào cây thuốc lá *Nicotiana Tabacum* và mô lá cây cà ức *S. laciniatum* bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng* 1: 23-28.
- Nguyễn Thị Thanh, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Phở, Nguyễn Văn Uyên (1998) Tạo cây cà tím (*Solanum melongena* L.) mang gen *Bt*, gen *bar* và gen *gusA* dùng phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.
- Nguyễn Thị Thanh, Lê Tấn Đức, Nguyễn Văn Uyên (1999) Tạo cây cải bông (*Brassica oleracea* var *botrycis*) và cây cải xanh (*Brassica juncea*) mang gen kháng sâu *cryIA(c)* và gen *bar* kháng thuốc cỏ dai thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 1287-1295.
- Nguyễn Thúy Hà, Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Ty, Nguyễn Hữu Hiến, Phan Quốc Kinh, Lê Trần Bình, Phan Văn Chi (1999) Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa cho protein bất hoạt ribosome nhóm 1 ở *E. coli*. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 1121-1128.
- Nguyễn Văn Bộ (2001) Khoa học và công nghệ nông nghiệp: Kết quả và định hướng. *Tạp chí Hoạt động Khoa học* 3: 2-6.
- Nguyễn Văn Uyên (1997) Một số suy nghĩ về an toàn sinh học. *Tạp chí Hoạt động Khoa học* 8.
- Nguyễn Văn Uyên, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ (2003) Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003*: 866-869.
- Osborn A, Vidal J (2002) US takes tough line on GM food labelling. *The Guardian Weekly*, 11/7/2002: 5. <http://www.dawnone.com/GMfoodq.htm>
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3324-3328.
- Phạm Bích Ngọc, Đinh Thị Phòng, Egnin M, Prakash CS, Lê Trần Bình (2002) Hoàn thiện phương pháp chuyển gen vào một số giống khoai lang Việt Nam thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 40(ĐB): 142-149.
- Phan Tố Phương, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (1994) Biến nạp gen vào cây *Arabidopsis* thông qua

tác nhân trung gian là *Agrobacterium*. *Hội nghị Công nghệ Sinh học và Hóa sinh Toàn quốc*.

Phan Tố Phương, Phạm Thu Hằng, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý, Lili C, Zhang S, Fauquet CM, Beachy RN (1998) Chuyển gen kháng hygromycin, gen *gus* và gen kháng bệnh bạc lá vào lúa bằng súng bắn gen. *Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây Lúa*.

Phan Tường Lộc, Nguyễn Hữu Hổ (2003) Tái sinh cây khoai mì (*Manihot esculenta*) thông qua con đường phát sinh phôi phục vụ nghiên cứu chuyển gen. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003*: 907-909.

Pinto YM, Kok RA, Baulcombe DC (1999) Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nature Biotechnol* 17: 702-707.

Qaim M, Zilberman D (2003) Yield effects of genetically modified crops in developing countries *Science* 299: 900-902.

Riazuddin S, Husnain T, Khan E, Karim S, Khanum M, Altosaar I (1996) Transformation of indica rice with *lbt* pesticidal genes. *Rice Genet* 11: 730-734.

Simons JP, McClenaghan M, Clack AJ (1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep betalactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328: 530-532.

Sinh vật chuyển gen (2000). *Tạp chí Hoạt động Khoa học* 10: 39-41.

Skeffett JH Genetically modified plants: Developing countries and the public acceptance debate. http://binas.unido.org/binas/show.php?id=22&type=html&table=book_sources&dir=reviews

South Africa National Department of Agriculture (2002) Genetically modified organisms that have been cleared for commercial release and/or for food and animal feed only. <http://www.nda.agric.za/geneticresources/AnnexureB.html>

Stamps J (2002) Trade in biotechnology food products. *Int Econ Rev*, 12/2002.

The Royal Society (1999) Non-food crops: Response to the House of Lords select committee inquiry on non-food crops. <http://www.royalsoc.ac.uk/files/statfiles/document-31.pdf>

Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải (1997) Chuyển tổ hợp gen GUS-BNG vào cây thuốc lá. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 2: 23-27.

Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyến (2003) Nghiên cứu quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) từ phôi soma. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2003*: 831-836.

Van Aken J (2000) Genetically engineered bacteria: U.S. lets bad gene out of the bottle. *Greenpeace Report*.

Võ Thị Thứ, Nguyễn Thị Hoa, Trần Văn Dương (2002) Nghiên cứu tách dòng gen *cryV* (*cryII*) từ chủng *Bacillus thuringiensis* D3 phân lập. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 2000 - 2001*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 404-409.

Wright S (1994) Molecular politics - developing American and British regulatory policy for genetic engineering 1972-1982. *University of Chicago Press*: 76.

Wu R (1998) Chapter 9. Discovery of transgenic plants, In: *Discoveries in plant biology*, Kung SD, Yang SF, eds. World Scientific Publishing Co., Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 115-129.

GENETICALLY MODIFIED CROPS: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

Le Thi Thu Hien, Pham Bich Ngoc,
Nong Van Hai*, Le Tran Binh
Institute of Biotechnology

SUMMARY

For hundreds of years farmers and plant breeders have used conventional agricultural biotechnology techniques, such as selective breeding and crossbreeding of related species to produce offspring with specific traits. These

* Author for correspondence: Tel: 04. 7562934, Fax: 04. 8363144, Email: vhnong@is-1.ac.vn

techniques, however, can be time-consuming and may require breeding several generations to obtain desired characteristics and breed out unwanted traits. Modern biotechnology with various novel and powerful techniques, most notable genetic engineering, enables plant breeders to bring together in one crop useful genes (accessed from a wide range of living sources, not just from within the crop species or from closely related plants) and allows them to develop faster genetically modified (GM) crops and their products with desired traits such as insect/ virus infection resistance, certain herbicide tolerance, nutritional content enhancement, etc. Modern biotechnology and GM crops have been used and resulted in significant benefits. These include higher crop yields, reduced farm costs, increased farm profit, improvement in health and the environment, etc. Many countries in the world, leading by the USA, Argentina, Canada and China have carried out research and development in GM crops. Recently, several Southeast Asian countries including Vietnam have also established high capacity for genetic engineering. However, a number of concerns regarding the potential negative effects of GM crops released into the environment on ecological system and human health and the labelling issue of GM foods have also been raised. Many effective monitoring approaches have been taken to expand the benefits and minimize risks of these useful products obtained through modern biotechnology.

Key words: Biosafety, biotechnology, conventional biotechnology, genetic engineering, genetically modified crops, genetically modified organisms

Ngày nhận bài: 17. 3. 2004, ngày nhận đăng: 7. 5. 2004

CHUYỂN GEN THÔNG QUA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* VÀO GIỐNG LÚA C71

Nguyễn Thị Hồng Châu, Nguyễn Phương Thảo,
Lê Trần Bình, Lê Thị Muội

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Lúa là loại cây trồng một lá mầm đầu tiên được chuyển gen và tái sinh trong đó bao gồm lúa *Indica* và *Japonica*. Gần đây, hệ thống chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* đang ngày càng được phát triển mạnh mẽ trên thế giới. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số hệ thống chuyển gen vào mô sẹo tạo từ phôi lúa trưởng thành giống C71 (*Indica*) và tối ưu được phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào giống lúa C71. Mô sẹo của phôi lúa trưởng thành giống C71 được đồng nuôi cấy với chủng *A. tumefaciens* LBA4404/pC1300, LBA4404/pC1301 và chủng EHA105/pC-1300 mang đoạn gen kháng hygromycine có khả năng sinh trưởng trên môi trường chọn lọc chứa hygromycine. Cây chuyển gen có khả năng kháng hygromycine được khẳng định sự có mặt của đoạn T-DNA trong genome bằng kỹ thuật PCR. Chúng tôi đã thu được 3 dòng cây chuyển gen *CryIA(c)* dương tính và các dòng cây dương tính này được trồng trong điều kiện nhà lưới. Biểu hiện sự có mặt của gen *CryIA(c)* đã được khẳng định ở cây thế hệ R0 và R1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử PCR cho thấy đoạn T-DNA mang gen *CryIA(c)* đã được gắn vào và biểu hiện trong tế bào cây lúa C71.

Từ khóa: Bệnh bạc lá, chuyển gen thông qua *Agrobacterium*, *Indica rice*, C71, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*

MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực quan trọng nhất. Hơn một nửa dân số trên thế giới sử dụng lúa như nguồn cung cấp lương thực chính. Ở Việt Nam, lúa được trồng rộng rãi và là nguồn lương thực chủ yếu. Tuy nhiên, năng suất lúa phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện ngoại cảnh như khí hậu, thời tiết, đặc điểm thổ nhưỡng và sâu bệnh (Lê Trần Bình *et al.*, 1998). Hiện nay, sự phát triển của công nghệ sinh học, đặc biệt là kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật di truyền và kỹ thuật phân tử cho phép các nhà tạo giống nâng

cao tính chống chịu của cây trồng một cách nhanh chóng (Lê Trần Bình *et al.*, 1997).

Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ngày càng được ứng dụng rộng rãi để chuyển một hay nhiều gen vào cây trồng (Grant *et al.*, 1991). Tính ưu việt của hệ thống chuyển gen này là hiệu quả tạo cây chuyển gen bền vững cao, có thể chuyển một đoạn DNA có kích thước tương đối lớn, không cần đến thiết bị cũng như hệ thống nuôi cấy phức tạp (Dai *et al.*, 2001). Ngoài ra, lượng bản sao gen chuyển ít, tạo thuận lợi trong việc phân tích cũng như biểu hiện gen mới trong cây chuyển gen (Zhang *et al.*,

1988). Những năm gần đây bắt đầu có những kết quả nghiên cứu về khả năng chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở cây lúa trong đó đã chuyển gen thành công cả ở lúa *Japonica* và lúa *Indica* là loại có khả năng tái sinh và chuyển gen thấp hơn so với lúa *Japonica*.

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là dùng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* để tạo cây lúa mang các gen kháng sâu bệnh. Bước đầu, chúng tôi tiến hành chuyển các gen *CryIA(b)*, *CryIA(c)* - gen mã hóa cho protein độc tố trừ sâu của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) và gen *Xa21* - gen kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* gây nên vào giống lúa C71 (*Indica*) (Fauquet *et al.*, 1996; Peferoen *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 2000).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mô sẹo 15 - 25 ngày tuổi từ hạt của giống lúa C71 do Viện Bảo vệ thực vật cung cấp, được dùng làm vật liệu để chuyển gen.

Chủng/vector LBA4404/pC1300, LBA-4404/pC1301 do Viện Nghiên cứu thuốc lá, Nhật Bản cung cấp mang gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá và gen *CryIA(b)* kháng sâu đục thân do phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế. Vector EHA105/pC1300 do Trung tâm CAMBIA, Australia cung cấp, được phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế mang gen *CryIA(c)* kháng sâu đục thân. Các vector này đều mang gen chỉ thị *gus* và gen chọn lọc kháng hygromycine *hpt* (Zheng *et al.*, 1991).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo cây chuyển gen

Tạo mô sẹo

Hạt lúa C71 bóc vỏ, khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, nước giaven 60% trong 25 phút, rửa kỹ bằng nước cất tiệt trùng 3 lần. Hạt đã khử trùng được thấm khô trên giấy thấm tiệt trùng và cấy lên môi trường tạo mô sẹo, nuôi trong tối, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở lúa

Môi trường	Thành phần
Tạo mô sẹo từ phôi hạt (C)	MS*; 30 g/l sucrose; 10 g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D
Tái sinh cây lúa (R)	MS*; 30 g/l sucrose; 10 g/l agar; 0,5 mg/l NAA; 2,0 mg/l BAP
Nuôi cấy vi khuẩn (LB)	5 g/l yeast extract; 10 g/l tryptone; 10 g/l NaCl; 16 g/l agar; pH 7,0
Tạo huyền phù vi khuẩn (MS, MSA)	MS*; 30 g/l sucrose MS*; 30 g/l sucrose; 100 μM acetosyringone
Môi trường cộng sinh (CA)	MS*; 30 g/l sucrose; 10 g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D; 50 μM acetosyringone
Môi trường chọn lọc (CH)	MS*; 30 g/l sucrose; 10 g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D; 50 mg/l hygromycine; 250 mg/l cefotaxime

MS* là môi trường nuôi cấy theo Murashige, Skoog (Murashige *et al.*, 1962)

Tạo dịch huyền phù A. tumefaciens, nhiễm mô sẹo và nuôi cộng sinh

Khuẩn lạc được lấy từ glycerol nuôi trong môi trường LB lỏng (Bảng 1), lắc 220 vòng/phút ở 28°C trong 12 giờ - 14 giờ.

Cấy quét trên môi trường LB thạch có bổ sung kanamycine 50 mg/l, nuôi ở 29°C trong 3 ngày. Lấy một khuẩn lạc vi khuẩn lắc 220 vòng/phút, 28°C qua đêm trong 100 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycine 50 mg/l. Lấy ra 4 ml cho vào môi trường LB lỏng mới, nuôi lắc tiếp 4 giờ trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào rồi hòa tan vào môi trường MS lỏng có bổ sung acetosyringone để tăng hiệu quả chuyển gen (Hood *et al.*, 1993; Godwin *et al.*, 1990).

Mô sẹo lúa (Lee *et al.*, 1991) 15 - 18 ngày tuổi, được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có mật độ $OD_{660nm} = 0,2 - 0,4$ ($1,0 OD_{660nm} = 3.10^9$ tế bào) trong 15 phút. Sau khi thấm khô dịch môi trường trên giấy lọc khử trùng, mô sẹo được nuôi cộng sinh với vi khuẩn trong 3 ngày trên môi trường cộng sinh, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, trong tối (Hiei *et al.*, 1994).

Chọn lọc mô sẹo, chuyển gen và tái sinh cây

Sau ba ngày, mô sẹo được ngâm và rửa vi khuẩn trong môi trường lỏng nuôi mô sẹo có bổ sung 300 mg/l cefotaxime. Sau khi thấm khô trên giấy thấm, mô sẹo được cấy lên môi trường chọn lọc có chứa 50 mg/l hygromycine và 250 mg/l cefotaxime trong 3 - 4 tuần. Những mô sẹo sống sót được cấy chuyển lên môi trường tái sinh, đặt dưới giàn đèn 2000 lux, 8/16 giờ, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

DNA được tách nhanh theo phương pháp của Egnin' và cộng sự: 1,2 g lá được nghiền kỹ trong nitor lỏng thành dạng bột mịn. Dịch nghiền được bổ sung 1 ml buffer A (50 mM tris HCl pH = 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM EDTA; 2% PVP; 0,1% sodium ascorbate;

1,5% sarkosine; 1 g/100 ml buffer A) và giữ lạnh 2 phút rồi thêm 1 ml phenol/chloroform, lắc kỹ sau đó để lạnh trong đá 5 phút rồi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, tốc độ 10000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch nổi được chuyển sang ống khác có sẵn 1 ml isopropanol, lắc nhẹ và giữ lạnh ở - 20°C trong 30 phút sau đó ly tâm 10000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, loại bỏ phần dịch nổi, rửa cón và làm khô DNA bằng máy Speed - Vac.

DNA được hòa tan trong TE và dùng làm mẫu để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR.

Kỹ thuật PCR được dùng để kiểm tra sự có mặt của gen CryIA(c) với 30 chu trình nhiệt: 95°C - 3 phút, 95°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút, 72°C - 10 phút lưu giữ 4°C; sử dụng cặp mồi có trình tự: 5'-AGGTGCTGGGTTCGTTCTCG -3' và 5'-CATTGTTGTTCTGTGCTGGGATTT -3'.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

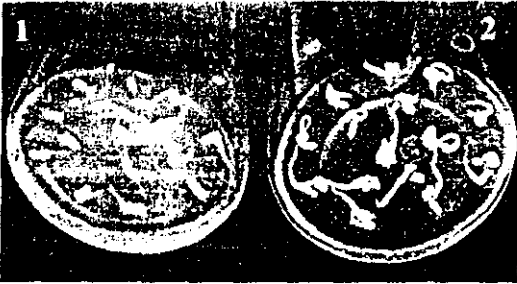
Chọn lọc mô sẹo và tái sinh cây

Tỷ lệ tạo mô sẹo ở giống lúa C71 khoảng 92% cao tương đương với tỷ lệ tạo mô sẹo của giống lúa Binatoa (*Indica*) do Noorain và cộng sự thực hiện (Noorain *et al.*, 1997).

Sau 3 - 4 tuần chọn lọc trên môi trường có hygromycine, các mô sẹo đối chứng không nhiễm khuẩn và một số mô sẹo nhiễm khuẩn bắt đầu chuyển dần sang màu nâu đen (Hình 2).

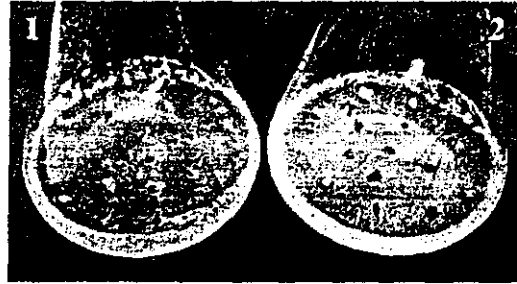
Các mô sẹo đối chứng chuyển sang màu nâu đen rõ rệt so với các mô sẹo nhiễm khuẩn. Hầu hết các mô sẹo đối chứng đều chết sau 4 tuần chọn lọc (Hình 3).

Qua thí nghiệm chúng tôi nhận thấy mô sẹo từ 15 - 18 ngày tuổi dùng chuyển gen là tốt nhất. Kết quả thu được tỷ lệ mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc trên môi trường có hygromycine cao hơn Noorain và cộng sự thực hiện khoảng 15%.



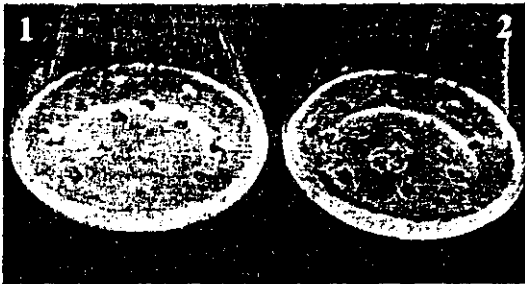
Hình 1. Tạo mô sẹo ở giống lúa C71

- 1: Hạt bắt đầu tạo mô sẹo
2: Mô sẹo 14 ngày tuổi



Hình 2. Mô sẹo trên môi trường chọn lọc

- 1: Mô sẹo mới đưa vào chọn lọc
2: Mô sẹo sau 3 tuần chọn lọc



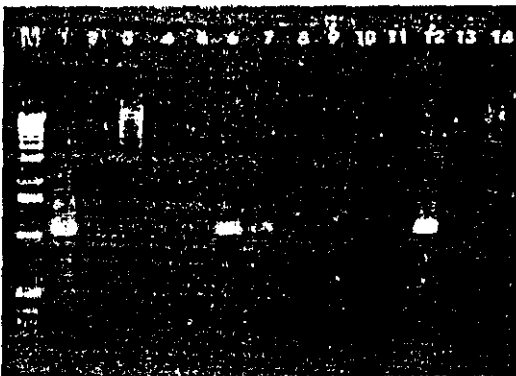
Hình 3. Chọn lọc mô sẹo

- 1: Mô sẹo đã nhiễm khuẩn sau 3 tuần chọn lọc
2: Mô sẹo không nhiễm khuẩn sau 3 tuần chọn lọc



Hình 4. Cây tái sinh

- 1: Cây tái sinh sau 15 ngày
2: Cây tái sinh sau 50 ngày, đã tạo rễ



Hình 5. Kết quả amplification gen *CryIA(c)* bằng kỹ thuật PCR

- M: Marker 1 kb. 1: Plasmid pC1300/*CryIA(c)*
6, 7, 12: Dương tính. 2-5, 8, 11, 13, 14: Âm tính



Hình 6. Cây lúa C71 chuyển gen *CryIA(c)* trồng ngoài nhà lưới

Do khả năng tái sinh của lúa *Indica* đã được Fauquet và cộng sự chứng minh là thấp hơn so với lúa *Japonica* nên để rút ngắn thời gian đồng thời tăng khả năng tái sinh của cây lúa chuyển gen, các mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc 3 - 4 tuần được chuyển lên môi trường R thay vì chọn lọc từ 6 - 8 tuần ở lúa *Japonica* (Fauquet *et al.*, 1996; Toki, 1997). Các mô sống sót này cho cây tái sinh sau khoảng 50 - 60 ngày (Hình 4).

Các cây được tách riêng từ cụm cây tái sinh và sau đó cấy chuyển lên môi trường R chọn lọc có hygromycine nồng độ 50 mg/l, chọn lọc từ 10 - 12 ngày, đối chứng là cây lúa C71 không chuyển gen và cây lúa C71 chuyển gen đã có kết quả PCR gen *hpt* dương tính. Tỷ lệ cây tái sinh và kết quả được trình bày ở bảng 2.

Tỷ lệ cây sống sót thu được so với tổng số cây chọn lọc sau khi chọn lọc trên môi trường có hygromycine khoảng 5% - 8,9%.

Bảng 2. Kết quả chọn lọc và tái sinh cây

TN	Số mô sẹo xử lý nhiễm khuẩn	Số mô sẹo sống sau chọn lọc/số mô sẹo chọn lọc	Số mô sẹo tái sinh	Số cây con	Số cây sống sau thử trên môi trường hygromycine /tổng số cây
Gen <i>CryIA(c)</i> (gen kháng sâu đục thân)					
1	750	300/750 (40%)	42 cụm cây tái sinh	631	56/631 (8,9%)
2	400	80/400 (20%)			
3	1600	400/1600 (25%)			
4	500	200/500 (40%)			
5	250	100/250 (40%)			
Gen <i>CryIA(b)</i> (gen kháng sâu đục thân)					
1	1300	503/1300 (38%)	78 cụm cây tái sinh	1015	51/1015 (5%)
2	600	430/1300 (33%)			
3	700				
Gen <i>Xa21</i> (gen kháng vi khuẩn <i>Xanthomonas oryzae</i> gây bệnh bạc lá)					
1	500	127/500 (25%)	53 cụm cây tái sinh	2032	174/ 2032 (8,6%)
2	500	114/500 (23%)			
3	500	145/500 (29%)			

Kết quả kiểm tra PCR và trồng thử nghiệm ngoài nhà lưới

DNA tổng số của các dòng cây chuyển gen sống trên môi trường hygromycine được tách theo phương pháp của Egnin và cộng sự có chất lượng tốt đủ điều kiện làm khuôn

mẫu để tiến hành phản ứng PCR và các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo. Các primer dùng để kiểm tra sự có mặt của gen *CryIA(c)* và *CryIA(b)* được thiết kế theo chương trình DNA Star.

Phản ứng PCR được dùng để kiểm tra

cây chuyển gen CryIA(c). Kết quả kiểm tra 45 dòng cây chuyển gen thu được 3 dòng cây dương tính thể hiện ở các cột 6, 7, 12 trên hình 5 của PCR. Tỷ lệ cây chuyển gen này cao hơn so với các kết quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào lúa *Indica* đã đạt được trước đây (Fauquet *et al.*, 1996).

Các cây chuyển gen CryIA(c) có kết quả PCR dương tính được đem trồng ngoài nhà lưới sinh trưởng và phát triển bình thường, không có biểu hiện gì khác lạ (Hình 6). Chúng tôi đã thu hạt thế hệ R1 của các dòng cây dương tính này. Một số hạt của các dòng cây R1 này đã được kiểm tra bằng PCR và đã thu được một dòng cây R1 dương tính.

KẾT LUẬN

Đã tối ưu được hệ thống chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* cho giống lúa C71 (*Indica*).

Đã xác định được nồng độ hygromycine 50 mg/l là thích hợp để sàng lọc cây lúa C71 chuyển gen.

Đã thu được 3 dòng cây dương tính PCR, các dòng cây PCR dương tính này đã được trồng thu hạt cho thấy khả năng sinh trưởng và phát triển bình thường, không có biểu hiện gì khác lạ so với cây không chuyển gen. Một dòng cây của thế hệ R1 được kiểm tra cho kết quả PCR dương tính.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành công trình này chúng tôi đã nhận được sự tài trợ về kinh phí và sự chỉ đạo của Bộ Khoa học và Công nghệ, Chương trình nghiên cứu Khoa học và phát triển Công nghệ sinh học KC.04.13.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dai S, Chang M, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy RN, Fauquet CM (2001) Comparative

analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7: 25-33.

Datta SK, Datta K, Kloti A, Wunn J, Burkhardt P, Ghosh BG, Ding HL, Futterer J, Potrykus I (1993) Genetic transformation system and transfer of genes of agronomic importance to IRRI breeding lines. In: *Sixth Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology*, February 1 - 5, 1993, Chiang Mai, Thailand: 8.

Fauquet CM, Zhang S, Chen L, Marmey P, de Kochko A, Beachy RN (1996) Biolistic transformation of rice: Now efficient and routine for *Japonica* and *Indica* rices. Rice genetics III. *Proceeding of the third International Rice Genetics Symposium*. Manila (Philippines) IRRI 16-20.

Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, Newbury HJ (1990) The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* - mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep* 9(12): 671-675.

Grant JE, Dommissie EM, Christey MC, Conner AJ (1991) Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: Murray DR, ed. *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology* CAB: 50-73.

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282.

Hood EE, Gelvin AB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2: 208-218.

Lee N, Wang Y, Yang J, Ge K, Huang S, Tan J, Testa D (1991) Efficient transformation and regeneration of rice small cell groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6389.

Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997) Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998) *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Noorain M, Rasul K, Mohammad A, Rafiqul IM, Zeba SI (1997) Transformation of an *Indica* rice

- cultivar Binnatoa with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tiss Cult* 7(2): 71-80.
- Peferoen M (1992) Engineering of insect-resistance plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. In: Gatehouse AMR, Hilder VA, Boulter D eds. *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB International, Wallingford, UK: 135-153.
- Toki S (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol Biol Rep* 15(1): 16-21.
- Tu J, Datta K, Khush GS, Zhang Q, Datta SK (2000) Field performance of *Xa21* transgenic *Indica* rice (*Oryza sativa* L.), IR72. *Theor Appl Genet* 101: 15-20.
- Wu C, Fan Y, Zhang C, Oliva N, Datta SK (1997) Transgenic fertile *Japonica* rice plants expressing a modified *CryIA(b)* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Rep* 17: 129-132.
- Zhang W, Wu R (1988) Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplast and correctly regulated expression of the foreign gene in plants. *Theor Appl Genet* 76: 835.
- Zheng Z, Hayashimoto A, Li Z, Murai N (1991) Hygromycin resistance gene cassettes for vector construction and selection of transformed rice protoplast. *Plant Physiol* 97: 832.

TRANSFORMATION OF AN *INDICA* RICE CULTIVAR C71 VIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Nguyen Thi Hong Chau, Nguyen Phuong Thao,
Le Tran Binh*, Le Thi Muoi

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Rice was the first major monocot crop to be transformed and regenerated. A number of *Indica* and *Javanica* cultivars has been used respectively. Recently, transformation via *Agrobacterium* has been developed that is less genotype dependent. We have transformed embryo-derived culture of *Indica* rice C71 using several different *Agrobacterium*-mediated gene transfer systems. Mature embryos of C71 cultivars were inoculated with the LBA4404/pC1300, LBA4404/pC1301 and EHA105/pC1300 strains. Embryos subsequently were inoculated with LBA4404/pC1300, LBA4404/pC1301 and EHA105/pC1300 conferring hygromycin resistance and grew on selective level of hygromycin. The transformed status of this tissue was confirmed by hygromycin test that showed transferred DNA (T-DNA) was present in the rice genome. We achieved 3 positive lines containing *CryIA(c)* gene. Integration, expression and transmission of the *CryIA(c)* gene into C71 cultivars (R0 and R1 generation plants) were confirmed by molecular analysis and the plant were grown in the

* Author for correspondence: Tel: 04.7564691, Fax: 04. 8363144, E-mail: binh@ibt.ac.vn

Nguyễn Thị Hồng Châu *et al.*

green house. We conclude that T-DNA has been intergrated into rice cells by PCR analysis. This report summarizes progress on transformation method via *Agrobacterium* for the *Indica* C71 rice cultivar.

Key words: *CryIA(b)*, *CryIA(c)*, *C71*, *Indica* rice, transformation

Ngày nhận bài: 11. 08. 2003, ngày nhận đăng: 15. 12. 2003

5.0.3

TẠO CÂY HỒNG (*PAULOWNIA FORTUNE*) CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM* *TUMEFACIENS*

Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyên
Viện Sinh học Nhiệt đới, Trung tâm KHTN&CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hồng (*Paulownia*) có nguồn gốc từ vùng Đông Á, được trồng nhiều trên thế giới như ở Trung Quốc, Nhật bản, Bắc Mỹ và Châu Úc. Đây là cây chống chịu khô hạn, giữ đất tốt và có giá trị kinh tế cao nhờ gỗ chắc, có vân đẹp, khó biến dạng bởi thời tiết trong đó đặc điểm nổi bật là sinh trưởng rất nhanh, sau 6 năm trồng có thể khai thác gỗ. Gỗ được dùng làm đồ trang trí nội thất, đồ thủ công mỹ nghệ và nhạc cụ. Nên có thể xem cây Hồng vừa bảo vệ môi trường, phủ xanh đồi trọc, vừa mang lại nguồn kinh tế cao. Tuy nhiên, là cây lại rất lớn, tỉ lệ đậm cao có thể dùng làm thức ăn gia súc nên thường hay bị các côn trùng phá hoại làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây.

Đặc biệt đây là cây rừng lán là rộng nên việc chăm sóc và phòng trừ sâu rất khó khăn, để tạo cây Hồng kháng sâu bằng phương pháp lai tạo truyền thống càng khó khăn hơn vì đây là cây lâu năm đồng thời rất khó tìm được dòng cây Hồng kháng sâu sẵn trong tự nhiên. Do đó để nhanh chóng tạo được cây Hồng có tính kháng sâu cao, chúng tôi đã dùng kỹ thuật di truyền để chuyển gen kháng sâu vào cây Hồng bình thường. Có nhiều phương pháp để chuyển gen, chúng tôi nhận thấy phương pháp phổ biến và phù hợp với điều kiện thiết bị tại Việt Nam là sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để tiến hành chuyển gen kháng sâu vào cây.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi khuẩn và plasmid

Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 chứa plasmid ITB mang gen *cryIA(c)* (gen kháng sâu), gen *bar* (gen kháng thuốc trừ cỏ Basta) và gen *gusA* (gen chỉ thị). Môi trường giữ giống là LB có kháng sinh Kanamycin 100 mg/l. Để nhân giống phục vụ nghiên cứu chuyển gen, vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường AB (Chilton và cộng sự, 1974).

Nguyên liệu cây trồng

Sử dụng giống cây Hồng (*Paulownia fortunei*). Lá cây trong ống nghiệm kích thước khoảng 1-2cm² được dùng làm nguyên liệu chuyển gen.

Phương pháp chuyển gen

Sử dụng vi khuẩn đã lắc qua đêm để gây nhiễm mảnh lá, sau đó các mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường tái sinh tạo chồi (môi trường MS có 0,1 mg/l NAA và 10 mg/l BA) có bổ xung trong hai ngày của chất acetosyringone nồng độ 100µM. Sau đó rửa và diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bằng dung dịch kháng sinh Cefotaxim 500 mg/l trong thời gian 30 phút, chuyển các mảnh lá sang môi trường tái sinh tạo chồi có chứa chất chọn lọc là Phosphinothricin (PPT) và Cefotaxim 500 mg/l. Cấy truyền 2 tuần/lần trên cùng loại môi trường. Sau 6 tuần, mẫu lá có chồi tái sinh được cấy truyền sang môi trường ra rễ có chứa PPT. Một số cây ra rễ tốt được đưa ra trồng ở vườn ươm.

Phương pháp kiểm tra cây chuyển gen

+ Khảo sát khả năng phát triển của mẫu lá trên môi trường tái sinh và cây đối chứng trên môi trường MS có chứa chất chọn lọc PPT.

+ Kiểm tra cây chuyển gen bằng cách cấy trên môi trường ra rễ có chứa chất chọn lọc PPT.

+ Kiểm tra gen chỉ thị *gusA* bằng dung dịch X-Gluc: bằng cách ngâm các mảnh lá và chồi nhỏ với dung dịch X-Gluc khoảng 15 giờ ở 37°C, mẫu chuyển gen sẽ có màu xanh đậm đặc trưng, còn mẫu đối chứng sẽ không chuyển màu.

+ Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* được kiểm tra qua phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt: mồi 1: ACAGAAGACCCCTTCAATATC và mồi 2: GTTACCGAGTGAAGATGTAA. Kích thước đoạn ADN của gen

cryIA(c) ở cây chuyển gen và đối chứng dương tính plasmid được khuếch đại là 0,65Kb. Quy trình tách ADN thực vật được tiến hành theo phương pháp của Dellaporta (1983).

+ Các cây chuyển gen và đối chứng được phun thuốc trừ cỏ Basta để kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *bar* trong cây chuyển gen.

+ Các cây chuyển gen và đối chứng được kiểm tra sự biểu hiện của gen *cryIA(c)* qua khả năng kháng sâu bằng cách thả sâu xanh *Heliothis armigera* lên các mẫu lá trong đĩa petri.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

Ảnh hưởng của PPT đến mảnh lá và khả năng tái sinh chồi:

Trước khi tiến hành chuyển gen, chúng tôi khảo nghiệm ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đối với các mảnh lá đối chứng bằng cách đặt chúng vào môi trường tái sinh với các nồng độ 0,2,4,6 và 8 mg/l PPT. Theo dõi sau 4 tuần chúng tôi nhận thấy ở nồng độ 0 mg/l PPT các mảnh lá đã tạo mô sẹo và bắt đầu tái sinh tạo các chồi con, ở nồng độ 2mg/l còn một số mảnh lá còn duy trì được màu xanh nhưng không tạo được mô sẹo cũng như tái sinh. Riêng từ nồng độ 4 mg/l PPT trở lên các mẫu lá đều bị vàng 100% và không còn khả năng phát triển, do đó chúng tôi sử dụng nồng độ 4 mg/l PPT để chọn lọc mẫu lá sau khi xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Trên môi trường có PPT nồng độ 4 mg/l, đa số các mảnh lá bắt đầu vàng sau 2 tuần nuôi cấy, một số mảnh lá vẫn duy trì màu xanh nhưng không hình thành mô sẹo, chỉ một số ít khoảng 10% hình thành mô sẹo và một số trong đó bắt đầu tái sinh sau 5 tuần nuôi cấy. Sau giai đoạn chọn lọc này các chồi con được chuyển sang môi trường MS để ra rễ với 4 mg/l PPT. Và chỉ có vài dòng cây tiếp tục phát triển và ra rễ, được chúng tôi giả định là cây chuyển gen. Kết quả quá trình chuyển gen được thể hiện như sau:

Để khẳng định đây là những cây Hồng chuyển gen, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT với các nồng độ 0,2,4,6 mg/l đến

Bảng 1. Tỷ lệ tái sinh chồi và cây chuyển gen của các mảnh lá trên môi trường có 4mg/l PPT sau khi nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* và mẫu lá đối chứng

Thí nghiệm	Số mẫu lá	Số mẫu lá tạo mô sẹo	Số mẫu lá tái sinh chồi	Số lượng dòng cây chuyển gen	Tần số chuyển gen(%)
Chuyển gen	580	52	21	5	0,8
Đối chứng	30	0	0	0	0

cây Hồng đối chứng. Chỉ sau 2 tuần toàn bộ các cây đối chứng từ nồng độ 2 mg/l PPT trở lên đều bị vàng lá và chết nhanh chóng. Do đó, chúng tôi cấy cây Hồng giả định chuyển gen và cây đối chứng vào môi trường ra rễ với chất chọn lọc PPT nồng độ 4 mg/l để thử khả năng chống chịu, sau 2 tuần toàn bộ cây đối chứng chết hoàn toàn, trong khi các cây chuyển gen vẫn tiếp phát triển và ra rễ, giúp chúng tôi khẳng định đây là những cây Hồng đã được chuyển gen.

Sự biểu hiện gen *gusA* của cây chuyển gen

Các chồi nhỏ, mảnh lá của cây chuyển gen đã được xử lý với dung dịch X-Gluc, kết quả cho thấy chồi và mảnh lá này có màu xanh đậm đặc trưng khẳng định sự biểu hiện của gen *gusA* trong cây chuyển gen.

Sự biểu hiện của gen *bar* trong cây chuyển gen

Gen *bar* tạo tính trạng kháng thuốc trừ cỏ đã được khẳng định trong cây in vitro, tuy nhiên chúng tôi muốn tiếp tục khảo sát sự tồn tại ổn định và khả năng biểu hiện của gen này trên cây sau khi được trồng ra môi trường tự nhiên ngoài vườn ươm. Trước hết phải khảo sát ngưỡng gây chết 100% đối với cây đối chứng tại vườn ươm. Cây khoảng 1 tháng tuổi được phun thuốc trừ cỏ Basta với các nồng độ là 100, 150, 200 và 300 mg/l PPT, sau 2 tuần các cây được phun ở nồng độ 200 và 300 mg/l PPT hoàn toàn chết còn các cây ở nồng độ 100 và 150 mg/l PPT chỉ ở đỉnh cây bị vàng nâu và sau 4 tuần thì các cây này hồi phục tạo chồi từ các nhánh dưới. Do đó, chúng tôi sử dụng nồng độ 300 mg/l PPT để phun lên các cây chuyển gen 1 tháng tuổi tại vườn ươm. Sau 2 tuần nhận thấy các cây Hồng chuyển gen tiếp tục sinh trưởng và phát triển bình thường, chỉ có một dòng cây hơi bị vàng lá phía dưới nhưng vẫn sống và phát triển cho phép chúng tôi khẳng định một lần nữa đây là những cây Hồng đã nhận được gen chuyển.

Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* và khả năng kháng sâu của cây chuyển gen

Phân tích PCR với cặp mồi chuyên biệt cho gen *cryIA(c)* cho thấy các mẫu ADN của cây chuyển gen sau khi chạy điện di có xuất hiện các băng có kích thước 0,65Kb giống như mẫu đối chứng dương tính plasmid, chúng là kết quả của sự khuếch đại gen *cryIA(c)* trong khi mẫu cây đối chứng hoàn toàn không có băng. Qua đó chúng tôi khẳng định sự hiện diện của gen *cryIA(c)* trong nhiễm sắc thể của cây chuyển gen. Sau đó các cây Hồng chuyển gen được chuyển ra trồng trong vườn ươm. Để thử nghiệm tính kháng sâu các lá nhỏ được đặt trong đĩa petri cùng sâu xanh *Heliothis armigera*. Sau 3 ngày, với các lá đối

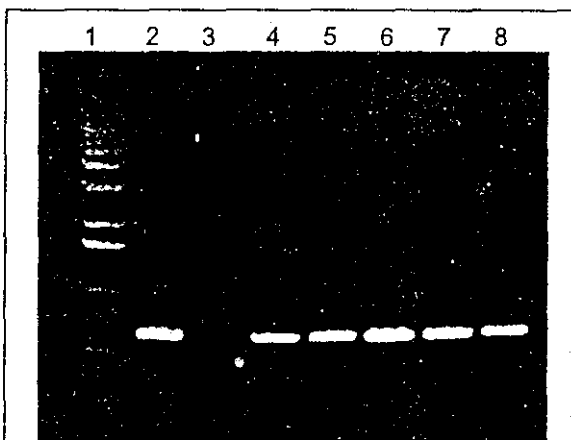
chúng diện tích lá bị hại lớn, kích thước sâu lằng rờ rệt, trong khi đó ở lá cây chuyển gen diện tích lá bị hại rất nhỏ, sâu tăng trưởng rất kém và sau 5 ngày sâu hoàn toàn không còn ăn và chết nhũn vào ngày thứ 5 hoặc 6.

KẾT LUẬN

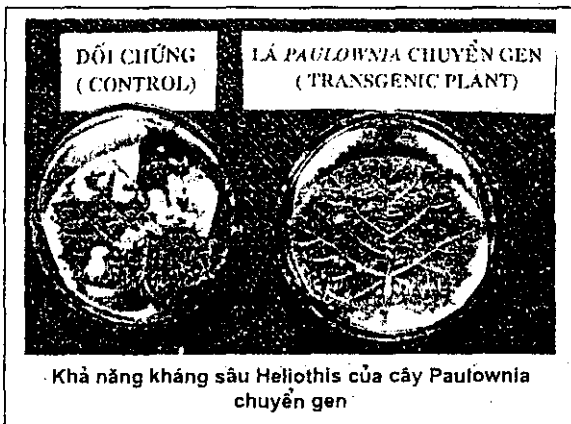
Với việc sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 mang plasmid ITB để chuyển gen, chúng tôi đã nhận được một số dòng cây Hồng chuyển gen mang gen *cryIA(c)* kháng sâu xanh *Heliothis armigera*. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử và sinh học chúng tôi đã xác định được các gen này hiện diện trong cây Hồng chuyển gen và các gen chuyển đã có biểu hiện tình trạng rất rõ rệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Ái Huyền, Vũ Ngọc Phương, Thái Xuân Du, Nguyễn Văn Uyên, 2001. Nhân giống vô tính cây Hồng (*Paulownia fortunei*) bằng nuôi cấy mô. Sách Công Nghệ Sinh học và Nông nghiệp sinh thái bên vùng tr. 63-68.
2. Delaporta SL, 1983. *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol. 1(4): 19-21.
3. Jefferson R, Kavanagh TA, 1987. *Gus fusion: glucuronidase as a selective and versatile gene fusion in higher plants*. EMBO 6:3901-3907.
4. Kumar PP, Rao UC, Goh C-J, 1988. Influence of auxin and lamina on adventitious shoot initiation from leaf of *Paulownia fortunei*. *Plant Cell Rep.* 17:886-890.
5. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyên, 2003. Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của lực nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. Đang gửi đăng tạp chí.
6. Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.



Kết quả phản ứng PCR của cây Paulownia chuyển gen
1: Thang chuẩn AND 1Kb; 2: Đối chứng dương tính Plasmide; 3: Đối chứng âm tính cây Paulownia; 4-8: Cây đã được chuyển gen



Khả năng kháng sâu *Heliothis* của cây Paulownia chuyển gen

SUMMARY

PRODUCTION OF TRANSGENIC PAULOWNIA PLANTS RESISTANT TO INSECT VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Le Tan Duc, Nguyen Huu Ho, Nguyen Van Uyen
Institute of Tropical Biology, NCST

The present study clearly demonstrates the efficient transfer of foreign genes into *Paulownia* plants. Transgenic *Paulownia* plants containing *bar* (herbicide resistance gene), *cryIA(c)* (insect resistance gene) and *gusA* (marker gene) genes were obtained via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 carried plasmid ITB02 (Institute of Tropical Biology). After co-cultivation, leaf disks were cultured on selection medium containing 4 mg/l PPT (Phosphinothricin). PCR analyses and indigogenic *Gus* assay were performed to confirm the presence and the expression of the *cryIA(c)* and *gusA* genes. The PPT-resistant transgenic plants were healthy within 15 days after spraying with chemical herbicide Basta (active ingredient PPT, 300mg/l). Insect bioassays with larvae showed an insect resistant to larvae against *Heliothis armigera*.

3.B.P.2

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH *IN VITRO* CÂY HỒNG (*PAULOWNIA FORTUNEI*) VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA TÁC NHÂN CHỌN LỌC ĐỂ TẠO CÂY CHUYỂN GEN.

Nguyễn Văn Uyên, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ
Viện Sinh học nhiệt đới, Trung tâm KHTN&CNQG

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hồng (*Paulownia*) có nguồn gốc từ vùng Đông Á, được trồng nhiều trên thế giới như ở Trung Quốc, Nhật Bản, Bắc Mỹ và Châu Úc. Đây là cây chống chịu khô hạn, giữ đất tốt và có giá trị kinh tế cao nhờ gỗ chắc, có vân đẹp, khó biến dạng bởi thời tiết trong đó đặc điểm nổi bật là sinh trưởng rất nhanh, sau 6 năm trồng có thể khai thác gỗ. Gỗ được dùng làm đồ trang trí nội thất, đồ thủ công mỹ nghệ và nhạc cụ. Nền có thể xem cây Hồng vừa bảo vệ môi trường, phủ xanh đồi trọc, vừa mang lại nguồn kinh tế cao. Tuy nhiên, lá cây lại rất lớn, tỉ lệ đạm cao có thể dùng làm thức ăn gia súc nên thường hay bị các côn trùng phá hoại làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây.

Đặc biệt đây là cây rừng với tán lá rộng nên việc chăm sóc và phòng trừ sâu rất khó khăn, để tạo cây Hồng kháng sâu bằng phương pháp lai tạo truyền thống càng khó khăn hơn vì đây là cây nhiều năm đồng thời rất khó để tìm được dòng cây Hồng kháng sâu sẵn trong tự nhiên. Do đó để nhanh chóng tạo được cây Hồng có tính kháng sâu cao chúng tôi muốn sử dụng kỹ thuật chuyển gen để tạo cây Hồng mang gen kháng sâu. Tuy nhiên, trước khi tiến hành việc chuyển gen, chúng tôi cần nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh *in-vitro* hoàn chỉnh cây Hồng từ mẫu lá, cuống hoặc thân cây, đồng thời, nghiên cứu ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc (yếu tố quan trọng trong quá trình chọn lọc tạo cây chuyển gen) là Phosphinothricin (PPT) đến mẫu mô và cây. Các nghiên cứu này sẽ cung cấp các thông số cần thiết phục vụ cho việc chuyển gen sau này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Sử dụng giống cây Hồng (*Paulownia fortunei*). Cây trong ống nghiệm được dùng làm nguyên liệu cho việc xây dựng hệ thống tái sinh cây Hồng.

Phương pháp

Tái sinh từ mảnh lá

Để tái sinh chồi từ mảnh lá, các cây con trong ống nghiệm cao khoảng 5-6 cm với 3-5 cặp lá được sử dụng. Các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1-2 cm² được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ cuống

Các cuống lá được cắt với chiều dài khoảng 5-10 mm được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ thân cây

Các đoạn thân cây với chiều dài khoảng 3-5 mm được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy MS (3) chứa 30g/l đường, 9 g/l Agar với sự hiện diện của các chất kích thích sinh trưởng theo tổ hợp là BA (1, 5, 10 mg/l) và NAA (0,1- 0,5- 1mg/l). Mỗi bình tam giác chứa khoảng 6-8 mẫu và mỗi nghiệm thức trung bình khoảng 30 mẫu. Các mẫu được đặt trong điều kiện 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 27- 28 °C. Sau 3 tuần cấy truyền một lần.

Ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc đối với mẫu mô

Các mảnh lá, cuống và thân cây được nuôi cấy trên môi trường tái sinh có chất chọn lọc PPT để khảo sát khả năng chống chịu và ngưỡng gây chết.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tái sinh chồi từ mảnh lá

Các mẫu lá với kích thước khoảng 2cm² được đặt trong môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả khả năng tái sinh sau 5 tuần nuôi cấy như sau:

Qua bảng trên chúng tôi nhận thấy với nồng độ BA thấp (1 mg/l) các mảnh lá gần như không thể tái sinh được chồi con, khi nồng độ BA cao hơn (5 mg/l) thì khả năng tái sinh cao hơn khoảng 60% khi kết hợp với NAA thấp (0,1 mg/l) và tỉ lệ mẫu lá tái sinh cao nhất (90%) khi nồng độ BA cao (10 mg/l) và nồng độ NAA thấp (0,1 mg/l). Kết quả

cho thấy, mảnh lá có khả năng tái sinh cao trong môi trường có các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ thích hợp, điều này sẽ tạo thuận lợi quá trình chuyển gen sau này.

Tái sinh chồi từ cuống

Khác với các nghiên cứu trước đây như của tác giả Đoàn Thị Ái Thuyền (1) và Kumar P.P (2) khi sử dụng cuống lá còn một ít phiến lá phía trên với kết quả các cuống lá tái sinh không qua giai đoạn mô sẹo mà tái sinh trực tiếp từ cuống. Còn ở nghiên cứu này, chúng tôi chỉ sử dụng các mẫu cuống với kích thước khoảng 5-10 mm được đặt trên môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả khả năng tái sinh như sau:

Từ bảng trên chúng tôi nhận thấy với nồng độ BA thấp (1 mg/l) các cuống lá chỉ hình thành mô sẹo mà không tái sinh được chồi con. Nồng độ BA cao hơn (5 mg/l) sẽ cho tỉ lệ tái sinh cao hơn (60%) và khả năng tái sinh cao nhất khi nồng độ BA cao (10 mg/l) và nồng độ NAA thấp (0,1- 0,5). Lượng NAA càng cao càng

lãng hình thành mô sẹo đồng thời ức chế sự hình thành chồi từ cuống lá. Ở tất cả các nghiệm thức mô cuống đều hình thành mô sẹo và các chồi con đều tái sinh thông qua mô sẹo.

Tái sinh chồi từ thân cây

Các mẫu thân với kích thước khoảng 2- 5 mm được đặt trên môi trường tái sinh với các chất sinh trưởng và kết quả khả năng tái sinh như sau:

Khác với các mẫu lá và cuống, trong thí nghiệm này ở tất cả các nghiệm thức nuôi cấy thân đều tái sinh chồi con cho thấy mô thân cây Hồng là mô tế bào có khả năng tái sinh cao ngay cả khi nồng độ BA thấp (1 mg/l) và khả năng tái sinh thấp khi lượng NAA càng cao. Môi trường thích

hợp nhất cho sự tái sinh từ thân cây là môi trường MS với 10 mg/l BA và 0,1mg/l NAA và được khuyến cáo sử dụng trong quá trình chọn lọc tạo cây chuyển gen.

Ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc đối với mẫu mô

Do dự kiến dùng Phosphinothricin (PPT) để chọn lọc tế bào chuyển gen nên chúng tôi đã bố trí một số thí nghiệm nhằm xác định nồng độ chất PPT thích hợp để chọn lọc tế bào đã nhận được gen chuyển và

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng mảnh lá tạo chồi	Phần trăm mảnh lá tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	0/30	0	++
1	0,5	0/21	0	++++
1	1	1/27	4	+++
5	0,1	17/29	60	+++
5	0,5	7/29	24	++++
5	1	10/30	30	+++
10	0,1	27/30	90	+++
10	0,5	18/28	64	+++
10	1	22/29	76	++++

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng cuống tạo chồi	Phần trăm cuống tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	0/30	0	++
1	0,5	0/35	0	+++
1	1	0/29	0	++++
5	0,1	14/24	60	+++
5	0,5	2/28	7	++++
5	1	2/30	6	++++
10	0,1	23/28	82	+++
10	0,5	29/36	80	+++
10	1	8/30	26	++++

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số lượng tạo chồi từ thân cây	Phần trăm thân cây tạo chồi	Mức độ hình thành mô sẹo
1	0,1	28/32	80	+++
1	0,5	28/36	55	++++
1	1	7/27	30	++++
5	0,1	30/36	83	+++
5	0,5	33/39	84	+++
5	1	12/27	44	++++
10	0,1	28/30	94	++++
10	0,5	20/30	66	+++
10	1	16/31	52	+++

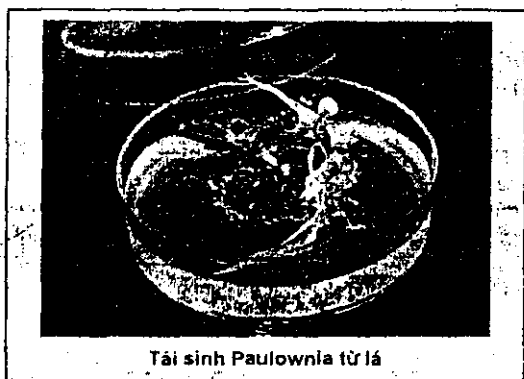
không làm ảnh hưởng đến quá trình tái sinh, các mẫu lá, cuống và thân được nuôi cấy môi trường tái sinh có chứa chất chọn lọc PPT nồng độ 0, 2, 4, 6 và 8 mg/l trong 4 tuần cho kết quả như sau:

- Mẫu lá ở nồng độ 2 mg/l: khoảng 30 % vẫn còn màu xanh nhưng không hình thành mô sẹo cũng như dấu hiệu của sự tái sinh chồi. Từ nồng độ 4 mg/l trở lên toàn bộ mẫu đều vàng và hoàn toàn không phát triển, do đó chúng ta có thể sử dụng nồng độ 4 mg/l cho việc chọn lọc tái sinh tạo cây chuyển gen.

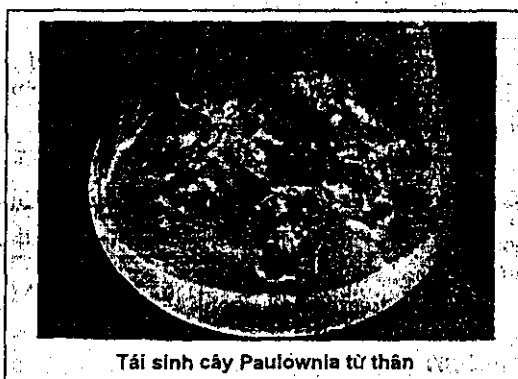
- Mẫu cuống và thân từ nồng độ 2 mg/l trở lên: toàn bộ mẫu đều vàng và hoàn toàn không phát triển, do đó chúng ta có thể sử dụng nồng độ 2 mg/l cho việc chọn lọc tái sinh tạo cây chuyển gen.

KẾT LUẬN

Các chất sinh trưởng là tác nhân quan trọng ảnh hưởng đến mức độ tái sinh của các mẫu lá, cuống và thân, trong đó mẫu thân thể hiện khả năng tái sinh cao nhất (94%). Trong nuôi cấy tái sinh cây Hồng tất cả các mô đều hình thành mô sẹo và chồi con tái sinh trực tiếp từ mô sẹo. Môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh chồi con từ các mô tế bào của cây Hồng là 10 mg/l BA và 0,1 mg/l NAA được chúng tôi khuyến cáo sử dụng cho việc tái sinh cây trong quá trình chuyển gen và có thể sử dụng nồng độ PPT là 4 mg/l đối với mẫu lá và 2 mg/l đối với cuống và thân trong việc chọn lọc tạo cây chuyển gen.



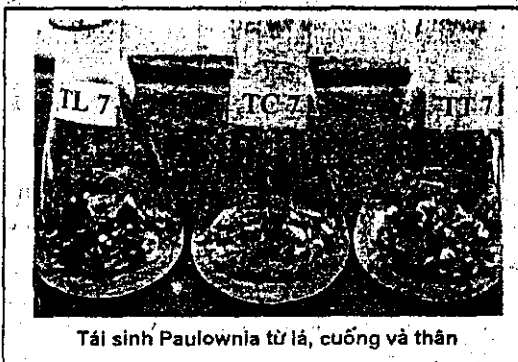
Tái sinh Paulownia từ lá



Tái sinh cây Paulownia từ thân



Tái sinh Paulownia từ cuống



Tái sinh Paulownia từ lá, cuống và thân

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Ái Huyền, Vũ Ngọc Phượng, Thái Xuân Du, Nguyễn Văn Uyển, 2001. Nhân giống vô tính cây Hồng (*Paulownia fortunei*) bằng nuôi cấy mô. Sách Công nghệ Sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững. tr.63-68.
2. Kumar PP, Rao DC, Goh C-J, 1988. Influence of petiole and lamina on adventitious shoot initiation from leaf of *Paulownia fortunei*. Plant Cell Rep. 17:886-890.
3. Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497.

SUMMARY

STUDY ON HIGH FREQUENCY SHOOT REGENERATION SYSTEM AND EFFECT OF
SELECTIVE AGENT ON THE GROWTH OF *PAULOWNIA* TISSUES CULTURED
IN VITRO FOR GENETIC TRANSFORMATION

Nguyen Van Uyen, Le Tan Duc, Nguyen Huu Ho
Institute of Tropical Biology, NCST

We show the optimization of conditions to culture various organ of *Paulownia* plant. High frequency, undirection regeneration of shoots was induced in leaf, petiole and stem cultures of *Paulownia fortunei*. The optimum culture medium for the explants was Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with 10 mg/l benzyladenine (BA) and 0.1 mg/l naphthalene acetic acid (NAA). The regeneration medium with 4 mg/l PPT (leaf explants) and 2 mg/l (petiole, stem) were suitable for selection of transformants. An efficient tissue culture system for high frequency plant regeneration from cultured tissue is a prerequisite for the success of plant transformation. Work on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation is underway in our laboratory.

TÁCH DÒNG VÀ ĐỌC TRÌNH TỰ GEN KHÁNG ĐẠO ÔN *PI-2(T)* TỪ GIỐNG LÚA C101A51

Phạm Quang Chung, Lê Trần Bình,
Nguyễn Đức Thành

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Pi-2(t) là một trong những gen kháng đạo ôn ở lúa đã được lập bản đồ, liên kết chặt với dấu phân tử RG64, nằm trên nhiễm sắc thể số 6, cách đoạn RG64 một khoảng 2,8 cM và có chiều dài là 1,2 kb. Gen này cho tính kháng ở cả hai giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây lúa. RG64 đã được đọc trình tự và dựa vào trình tự nucleotide này để thiết kế cặp mồi RG64F/RG64R. Bằng kỹ thuật PCR với việc sử dụng cặp mồi này chúng tôi đã thành công trong việc nhân được một đoạn gen có kích thước 1,2 kb từ giống lúa C101A51 (giống có mang gen kháng đạo ôn). Tiếp theo sản phẩm PCR mà có chứa đoạn gen kháng được tách dòng và đọc trình tự nucleotide. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* có độ tương đồng cao (99,35%) so với trình tự của các tác giả đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế.

Từ khóa: Gen kháng đạo ôn, *Oryza sativa* L., *Pi-2(t)*

MỞ ĐẦU

Hiện nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam, một số bệnh do virus, vi khuẩn, nấm đã gây nên những thiệt hại vô cùng to lớn và đang làm giảm đi chất lượng sản phẩm cũng như năng suất cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng. Đối với cây lúa thì một trong những bệnh có sức tàn phá mạnh nhất là bệnh đạo ôn. Bệnh này do nấm *Pyricularia oryzae* gây ra. Theo ước tính của FAO thiệt hại do bệnh này gây ra làm giảm năng suất lúa trung bình từ 0,7% - 17,5%. Những nơi bị bệnh nặng có thể bị giảm tới 80% (Bonman *et al.*, 1991; Tsai, 1998).

Vì vậy, vấn đề cần đặt ra là phải tạo được nhiều giống lúa kháng bệnh. Việc này sẽ hạn chế được việc sử dụng các loại thuốc

hóa học trừ sâu, ảnh hưởng tới sức khỏe con người, gia súc và môi trường sinh thái đồng thời giảm được tối thiểu sự thất thoát mùa vụ. Tuy nhiên, kinh nghiệm trước đây cho thấy rằng: Những giống lúa kháng thường bị mất tính kháng sau một vài vụ trồng. Do đó, cần phải tạo ra được những giống lúa có sức kháng bền hơn. Muốn vậy thì gen đa kháng phải được kết hợp từ nhiều cá thể khác nhau (Hittalmani *et al.*, 1994).

Ngày nay, với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học mà chủ công là các kỹ thuật chỉ thị phân tử cùng với các quan điểm lựa chọn chúng có thể cung cấp những giải pháp mới trong việc phát hiện, chọn lọc và duy trì nhiều kiểu gen kháng bền hơn ở lúa. Kết quả là một số lượng lớn gen kháng đạo ôn đã được lập bản đồ dựa trên các chỉ thị

phân tử như: *Pi1(t)*, *Pi2(t)*, *Pi4(t)*, *Pi5(t)*, *Pi6(t)*, *Pi9(t)*, *Pi10(t)* và *Pi11(t)* (Causse *et al.*, 1994), *Pi5(t)* và *Pi7(t)* (Wang *et al.*, 1994) *Pia*, *Pib*, *Pik*, *Pit*, *Pita*, *Pi12(t)*, *Pi17(t)*, *Pi18(t)*, *Pi19(t)*, *Pi20(t)*, *Pi23(t)*, *Pi62(t)* và *Pi157(t)* (Nagato, Yoshomura, 1998), *Pitq1*, *Pitq5*, *Pitq6* và *Pilm2* (Tabien *et al.*, 2000), *Pi21(t)* (Fukuoka *et al.*, 2001).

Trong bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả tách dòng, đọc trình tự nucleotide của gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* ở giống lúa CI101A51 và so sánh với trình tự của các tác giả đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế. *Pi-2(t)* là một trong những gen kháng đã được lập bản đồ, liên kết chặt với dấu phân tử RG64, nằm trên nhiễm sắc thể số 6, và cách đoạn RG64 một khoảng 2,8 cM. Gen này cho tính kháng ở cả hai giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây lúa (Hittalmani *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1998).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

- Giống lúa CI101A51 do Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.
- Vector tách dòng pCR2.1.TOPO được mua từ hãng Invitrogen.
- Chủng *E. coli* DH5 α được mua từ hãng GIBCO BRL life Technologies.
- Bộ hóa chất chuẩn xác định trình tự nucleotide được mua từ hãng Applied Biosystems.

Phương pháp tách DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ giống lúa CI101A51 theo phương pháp của Saghai Maroof và cộng sự (1984). Độ tinh khiết và nồng độ nucleotide được xác định bằng máy quang phổ hấp thụ (Hewlett Parkard).

Kỹ thuật PCR

PCR được tiến hành với tổng thể tích là 25 μ l/mẫu gồm những thành phần sau: DNA tổng số (50 ng); mỗi RG64F (20 ng); mỗi RG64R (20 ng); dNTP (2,5 mM); MgCl₂ (50 mM); enzyme Taq polymerase (0,5 đơn vị) và đệm thích hợp cho enzyme. Chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94°C - 5 phút; 94°C - 1 phút; 60°C - 1 phút; 72°C - 2 phút, lặp lại 39 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72°C - 5 phút; giữ nhiệt độ ở 4°C.

Cặp mỗi RG64F/RG64R sử dụng trong PCR có trình tự như sau:

Mỗi RG64F: 5'-GTTGTTTGAGCCCTC-CAATGCCTGTTC-3'.

Mỗi RG64R: 5'-CTGCACTGCAATCT-ACGGCCAGG-3'.

Tách dòng và đọc trình tự

Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector pCR2.1. Sau đó plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α . Các kỹ thuật dùng trong tách dòng gen đối với vật chủ là *E. coli* được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001).

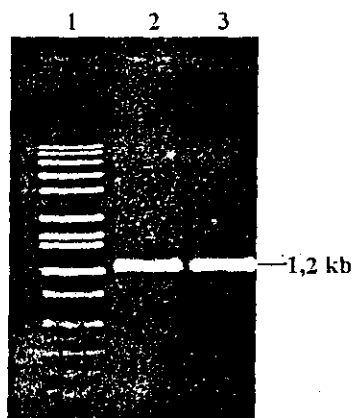
Trình tự nucleotide được xác định theo phương pháp của Sanger, sử dụng đoạn mỗi đã gắn huỳnh quang của bộ hóa chất chuẩn xác định trình tự DNA. Sau đó sản phẩm PCR đã gắn huỳnh quang được phân tích trên máy xác định trình tự DNA tự động (ABI 3100 - Avant Genetic Analyser) với bộ kit của hãng Applied Biosystems.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* bằng kỹ thuật PCR

Mẫu DNA tổng số của giống lúa CI101A51 sau khi tách chiết được pha loãng và xác định mức độ hấp thụ tử ngoại (OD) trên máy đo quang phổ đã đảm bảo đủ độ tinh khiết và nồng độ cần thiết được dùng

làm khuôn trong phản ứng PCR với cặp mồi RG64F/RG64R. Cặp mồi này được thiết kế dựa trên hai đầu của đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế. Theo lý thuyết, sử dụng cặp mồi này sẽ nhận được đoạn gen có kích thước 1,2 kb. Sản phẩm PCR hoàn thành được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, (Hình 1).



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR với cặp mồi RG64

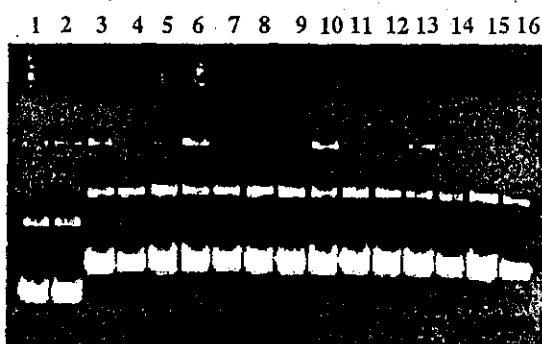
1: Marker
2,3: Sản phẩm PCR giống lúa C101A51

Qua kết quả điện di đồ cho thấy ở giống lúa C101A51, chúng tôi thu được sản phẩm PCR rất đặc hiệu, kích thước phân tử của đoạn được nhận lên khoảng 1,2 kb. Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết cũng như phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả nước ngoài khi họ sử dụng cặp mồi này để nghiên cứu giống lúa C101A51. Điều này chứng tỏ genome của giống C101A51 đã nghiên cứu có mang gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*.

Tách dòng gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*

Sau khi gắn sản phẩm PCR vào vector pCR2.1, chúng tôi tiến hành biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Cây trải trên môi trường thạch LB có bổ sung ampicillin, IPTG, X-gal. Trong môi trường chọn lọc này, theo lý thuyết thì các khuẩn lạc *E. coli* mang vector

tái tổ hợp sẽ có màu trắng trong khi đó các khuẩn lạc mang vector pCR2.1 gốc (không dính thêm DNA ngoại lai) sẽ có màu xanh. Để kiểm tra kết quả lai sản phẩm PCR vào vector pCR2.1 và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α , chúng tôi nhặt ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và xanh để tách chiết. Kết quả tách chiết DNA plasmid được tiến hành điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Điện di trên gel agarose 1% để chọn lọc các plasmid tái tổ hợp mang gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)*

1-2: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng
3-16: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh

Trên ảnh điện di ta thấy các plasmid ở các kênh 3 - 16 có khả năng là các plasmid tái tổ hợp vì chúng có kích thước lớn hơn vector pCR2.1 gốc và chúng tôi chọn các mẫu mang các plasmid có kích thước lớn này để tiếp tục nghiên cứu. Mặc dù vậy trong quá trình gắn sản phẩm PCR vào vector có thể có một số sản phẩm phụ cũng được gắn vào vector. Tức là, có những đoạn có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* cần nhận lên. Do đó, cần phải kiểm tra sản phẩm plasmid đã chọn bằng phương pháp cắt bằng enzyme hạn chế. Dựa vào bản đồ vector pCR2.1 có một điểm cắt của *EcoRI* nằm trong vùng cắt gần đa vị. Do đó, chúng tôi sử dụng enzyme *EcoRI* để cắt plasmid tái tổ hợp thành vector và đoạn DNA ngoại lai riêng rẽ. Chúng tôi đã tiến hành cắt mẫu mang khuẩn lạc có

màu trắng (mang đoạn DNA ngoại lai) và mẫu mang khuẩn lạc có màu xanh với enzyme *EcoRI*. Sau khi cắt, sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Điện di kiểm tra DNA plasmid tái tổ hợp cắt bằng enzyme hạn chế *EcoRI*

- 1: Marker
- 2: Sản phẩm PCR trước khi gắn vào vector
- 3: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh
- 4: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng
- 5: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh cắt bằng enzyme *EcoRI*
- 6: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng cắt bằng enzyme *EcoRI*

Qua ảnh điện di ta thấy, ở kênh số 5 sau khi cắt bằng enzyme *EcoRI* cho ra một băng có trọng lượng phân tử đúng bằng trọng lượng phân tử của plasmid pCR2.1 còn kênh số 6 cho ra hai băng. Một băng có kích thước tương ứng với kích thước của vector pCR2.1; một băng có kích thước 1,2 kb đúng bằng với kích thước của băng sản phẩm PCR. Điều này cho phép ta khẳng định sản phẩm PCR đã được gắn vào vector pCR2.1.

Xác định trình tự nucleotide đoạn DNA sản phẩm PCR

Mẫu plasmid mang gen *Pi-2(t)* của

giống lúa C101A51 đã được tách với số lượng lớn để xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế bằng chương trình phần mềm CLUSTAL W1.81. Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả phân tích cho thấy trình tự nucleotide của sản phẩm mà chúng tôi thu được sau phản ứng PCR so với trình tự mà các tác giả đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế có độ tương đồng cao (99,35%). Kết quả nhận được sẽ góp phần vào việc thiết kế vector mang gen *Pi-2(t)* phục vụ chuyển gen và phát triển lúa kháng đạo ôn trong tương lai.

KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi RG64F/RG64R, chúng tôi đã nhận được gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* có kích thước 1,2 kb từ DNA hệ gen của giống lúa C101A51.

Đã tách dòng phân tử gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* từ giống lúa C101A51 trong vector tách dòng pCR2.1.

Đã xác định trình tự nucleotide của gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* và so sánh với trình tự mà các tác giả đã công bố trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế. Kết quả có độ tương đồng cao 99,35%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bonman JM, Estrade BA, Kim CK, Lee EJ (1991) Assessment of blast disease and yield loss in susceptible and partial resistance rice cultivars in two irrigated lowland environments. *Plant Dis* 75.
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu KS, Xiao JH, Yu ZH, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch S, Tanksley SD (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Fukuoka S, Okuno K (2001) QTL analysis and mapping of pi21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor Appl Genet* 103: 185-190.

```

C101A51      --TGTTTGAGCTCTCCAATGCCGTGTTCTTATACGTAGTACTCCCTCCATNTCCAAAATAT
C101A51DC    GTTGTGTTGAGCCCTCCAATGCCGTGTTCTTATACGTAGTACTCCCTCCATT-CCAAAATAT
               *****
C101A51      ATGATGCCGTTGACTTTTCGTATAATGTTTGATTACTTGTCTTTTACAAATAAAATTATA
C101A51DC    ATGATGCCGTTGACTTTTCGTATAATGTTTGATTACTTGTCTTTTACAAATAAAATTATA
               *****
C101A51      TAAATATTATTTATTTTATGACTTATTTGATTATCAAATAGTTGTACATATTTATAC
C101A51DC    TAAATATTATTTATTTTATGACTTATTTGATTATCAAATAGTTGTACATATTTATAC
               *****
C101A51      AAATTCGTTTTTAATAAGATAAATCGTCAAATGTTACGAGAAAAATCAACGGTGTTATAT
C101A51DC    AAATTCGTTTTTAATAAGATAAATCGTCAAATGTTACGAGAAAAATCAACGGTGTTATAT
               *****
C101A51      ATTTTGGAACGGAGGTAGTACTACATAAGCACAACTAAAATTTGTTTATATGAGAATGT
C101A51DC    ATTTTGGAACGGAGGTAGTACTACATAAGCACAACTAAAATTTGTTTATATGAGAATGT
               *****
C101A51      GCAGCCGTCACCATAGATATGATTCGGTGCTATGGC-ATATTAGCACCATATAAATATTA
C101A51DC    GCAGCCGTCACCATAGATATGATTCGGTGCTATGGCGATATTAGCACCATATAAATATTA
               *****
C101A51      CAATCAAACATCTTCTGAACAACACACCAATTTATTTCTTTGATAAAATCGCACACAAA
C101A51DC    CAATCAAACATCTTCTGAACAACACACCAATTTATTTCTTTGATAAAATCGCACACAAA
               *****
C101A51      TTATTTGCTCGACTATGCTGTAGCAGAGATCTATGCCTCTCTGCAAAGTATCTTGTCACT
C101A51DC    TTATTTGCTCGACTATGCTGTAGCAGAGATCTATGCCTCTCTGCAAAGTATCTTGTCACT
               *****
C101A51      ATTCTGACAAGAGAGTAAAGCCTTAAATATAGCCTGGCATATATAATTATGTTCTTGCTA
C101A51DC    ATTCTGACAAGAGAGTAAAGCCTTAAATATAGCCTGGCATATATAATTATGTTCTTGCTA
               *****
C101A51      TTCCTGTATGCACGCGCACTAATTAGTTATGAAAACGCGTGTTGATGCTAAGAGCTTGT
C101A51DC    TTCCTGTATGCACGCGCACTAATTAGTTATGAAAACGCGTGTTGATGCTAAGAGCTTGT
               *****
C101A51      ACTGTATTTCTAACCAAAAAAAAAAATG-TTAACAAACCTAACATATATGCTAACTTGTGC
C101A51DC    ACTGTATTTCTAACCAAAAAAAAAAATG-TTAACAAACCTAACATATATGCTAACTTGTGC
               *****
C101A51      CAACTCAACAGCCCTACGAGATGACATGGTTTCCCATGCTCCACAGCATGTACCACGCC
C101A51DC    CAACTCAACAGCCCTACGAGATGACATGGTTTCCCATGCTCCACAGCATGTACCACGCC
               *****
C101A51      TAGAGCTAGAGGTAACCATAAGATGCAGGCCGTTGTGT--TCTGACCTTGTGAGTGTG
C101A51DC    TAGAGCTAGAGGTAACCATAAGATGCAGGCCGTTGTGTGTACCTGACCTTGTGAGTGTG
               *****
C101A51      TGTGTATCGATCACCATAGCATGTGCTCCACCCTGCCTCCATCACCATCTCTACTCTGAA
C101A51DC    TGTGTATCGATCACCATAGCATGTGCTCCACCCTGCCTCCATCACCATCTCTACTCTGAA
               *****
C101A51      GCTGACATGACCAACTGTTACACATGCGGCATCACTAGAGCTGAGGTGACCATCTGACCA
C101A51DC    GCTGACATGACCAACTGTTACACATGCGGCATCACTAGAGCTGAGGTGACCATCTGACCA
               *****
C101A51      AAGCTGATAGCCTGCCTTGGTGCGAACGCCTTTTGGACAGCATCCATGGACTCTGTGTTG
C101A51DC    AAGCTGATAGCCTGCCTTGGTGCGAACGCCTTTTGGACAGCATCCATGGACTCTGTGTTG
               *****
C101A51      GTACAGAAGTGGTTGCTCATACTTCTTGTAGTGCAAGTAACTTCTATTGGCAGAATGTA
C101A51DC    GTACAGAAGTGGTTGCTCATACTTCTTGTAGTGCAAGTAACTTCTATTGGCAGAATGTA
               *****
C101A51      TTTTGTCTCCGATTGATGCCTCCTAGCCCTGGCCGTACATTGCACTGCAG
C101A51DC    TTTTGTCTCCGATTGATGCCTCCTAGCCCTGGCCGTACATTGCACTGCAG
               *****

```

Hình 4. So sánh trình tự nucleotide của giống lúa C101A51 với trình tự đã công bố

C101A51DC: Giống lúa C101A51 mang gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã được Hittalmani và cộng sự độc lập trình tự và đã đăng ký trong ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

- Hittalmaier EA, Rodriguez RL, Huang N (1994) Identification of blast resistance gene *Pi-2(t)* via specific primer amplified genomic DNA. *Theor Appl Genet* 101: 1215-1225.
- Nagato T, Ohtsuka A (1993) Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *RCR* 10: 13-14.
- Saghai MA, El-Youssef KM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1984) Extraordinarily polymorphic micro-satellite DNA in barley: Species diversity, chromosome location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tabien RR, Li Z, Paterson AH, Marchetti MA, Stansel JW, Pinson SRM (2000) Mapping of four major rice blast resistance genes from "Lemont" and "Teqing" and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. *Theor Appl Genet* 101: 1215-1225.
- Tsai WH (1998) Estimation of rice yield losses caused by leaf blast disease. *J Taiwan Agric Res* 37.
- Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ (1994) RFLP mapping of conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar. *Genetics* 136: 1421-1434.
- Zheng KL, Chai RY, Jin ZM, Wu JL, Fan YY, Leung H, Zhang JY (1998) Mapping of leaf and blast resistance genes with RFLP, RAPD and resistance gene analog in rice. 2nd international rice blast conference, France 13.

CLONING AND SEQUENCING OF THE BLAST RESISTANCE GENE *PI-2(T)* FROM C101A51 RICE CULTIVAR

Pham Quang Chung, Le Tran Binh,
Nguyen Duc Thanh*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

PI-2(t) is one of the blast resistance genes mapped in rice, linked tightly to the RG64 marker. It lies on 6th chromosome, located 2.8 cM distant from the RFLP marker and has 1.2 kb length. *Pi-2(t)* is responsible for resistance at both growth and development stages of the rice. RG64 have been sequenced and based on the sequence data pairs of specific primers RG64F/RG64R were designed. By PCR technique, a 1.2 kb blast resistance gene fragment from genome of C101A51 rice cultivar carrying the blast resistance gene *Pi-2(t)* was successfully amplified. The PCR product that contained the blast resistance gene was cloned and sequenced. The results showed that the blast resistance gene *PI 2(t)* had a high identity (99.35%) as compared with those reported in the international gene bank.

Key words: Blast resistance gene, *Oryza sativa* L., *Pi-2(t)*

Ngày nhận bài: 05. 09. 2003, ngày nhận đăng: 07. 10. 2003

* Author for correspondence: Tel: 84-01-7561662, E-mail: ndthanh@pcg-ibt.ac.vn

PHỤ LỤC 4.

Hợp đồng chuyển giao nguyên vật liệu

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN
VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Số:

HỢP ĐỒNG CHUYỂN GIAO NGUYÊN LIỆU

Hợp đồng này có hiệu lực từ ngày 01 tháng 08 năm 2003 bởi và giữa:

- 1. Bên giao:** Viện Công nghệ Sinh học (IBT), Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc Gia (NCST)
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Điện thoại: 04 7563148;
Fax: 04 8363144
Tài khoản: 931.01.064 tại Kho bạc Nhà nước Ba Đình - Hà Nội
Đại diện là: Ông Lê Trần Bình, Viện Trưởng
Giao cho: Bà Đinh Thị Phòng, Cán bộ Nghiên cứu Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật triển khai thực hiện hợp đồng
- 2. Bên nhận:** Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi (RICFC), Công ty Bông Việt Nam (VCC)
Địa chỉ: Nha Hố, Ninh Sơn, Ninh Thuận
Điện thoại: 06 8853105 / 0913930186
Fax: 06 8853108
Tài khoản: 931.0100 00050 tại Kho bạc Nhà nước tỉnh Ninh Thuận
Đại diện là: Ông Lê Quang Quyền, Giám Đốc
Giao cho: Ông Nguyễn Trọng Tình, Chủ nhiệm Bộ môn Di truyền Giống tổ chức thực hiện.

IBT và RICFC thỏa thuận ký kết hợp đồng chuyển giao nguyên liệu (sau đây gọi tắt là Hợp đồng) với các điều khoản sau:

Điều 1: Nguyên liệu.

Thuật ngữ "Nguyên liệu" bao gồm:

- Chủng Agrobacterium mang gen mã hoá protein tinh thể độc tố *cryIA(b)*;
- Chủng Agrobacterium mang gen mã hoá protein tinh thể độc tố *cryIA(c)*;
- Chủng Agrobacterium mang gen kháng hạn P5CS

Tất cả các chủng agrobacterium đề cập trong (a), (b) và (c) đều do IBT cung cấp cho RICFC.

Điều 2: Chuyển giao Nguyên liệu. IBT sẽ cung cấp Nguyên liệu cho RICFC nêu trong Phụ lục 1 kèm theo Hợp đồng này.

Điều 3: Sử dụng Nguyên liệu. Nguyên liệu chỉ được sử dụng cho mục đích nghiên cứu chuyển gen kháng sâu và gen kháng hạn vào các giống Bông Việt Nam trong khuôn khổ triển khai thực hiện đề tài nhánh thuộc đề tài cấp Nhà nước KC.04.13 “Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen năng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi” giữa IBT và RICFC. IBT đồng ý tham gia đàm phán trên tinh thần hợp tác nếu RICFC có nhu cầu sử dụng Nguyên liệu cũng như các sản phẩm khoa học được tạo ra từ đề tài nhánh này để sản xuất thương mại hay cho các mục đích khác.

Điều 4: Trách nhiệm của RICFC.

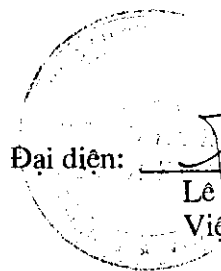
- a. **Bảo mật.** IBT chỉ cung cấp Nguyên liệu cho những cán bộ nghiên cứu liên quan của RICFC. RICFC có trách nhiệm lưu giữ và bảo mật Nguyên liệu. Nếu không được sự đồng ý của IBT, RICFC không công bố hay chuyển giao Nguyên liệu cho bất kỳ bên thứ ba nào khác. Thuật ngữ “Nguyên liệu” trong Điều 4a. không bao gồm các Nguyên liệu: i) đã được công bố rộng rãi; ii) là sản phẩm sở hữu của Bên Nhận hoặc Bên Nhận có được từ nguồn khác; iii) được IBT cho phép công bố bằng văn bản; iv) bắt buộc phải công bố do luật hoặc điều luật Quốc Gia quy định.
- b. **Báo cáo.** RICFC có trách nhiệm báo cáo định kỳ sáu (6) tháng/1 lần cho IBT và báo cáo tổng kết trước ba mươi (30) ngày tính từ ngày hết hạn hợp đồng về tình hình và kết quả thực hiện đề tài nhánh.
- c. **Công trình công bố.** RICFC có trách nhiệm cung cấp cho IBT tất cả sản phẩm khoa học có sử dụng Nguyên liệu như bản thảo bài báo, báo cáo hội nghị ít nhất sáu mươi (60) ngày trước ngày công bố. Nếu thấy cần thiết, IBT có quyền tạm dừng công bố các ấn phẩm này để tiến hành các đăng ký sở hữu trí tuệ.

Điều 5: Sử dụng và chuyển nhượng Nguyên liệu. RICFC có trách nhiệm sử dụng Nguyên liệu được chuyển giao theo đúng luật và các quy định hiện hành của Việt Nam. IBT không có trách nhiệm đối với bất kỳ rủi ro hoặc thiệt hại phát sinh nào do RICFC sử dụng nguyên liệu. RICFC có nghĩa vụ hợp tác chặt chẽ và bảo vệ IBT khỏi các ảnh hưởng bất lợi phát sinh do việc sử dụng Nguyên liệu chuyển giao.

Điều 6: Sở hữu Nguyên liệu. Tất cả Nguyên liệu (kể cả các bản sao) là tài sản của IBT. RICFC có trách nhiệm huỷ bỏ hoặc trả lại toàn bộ Nguyên liệu cho IBT ngay sau khi hết hạn Hợp đồng.

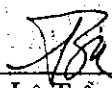
Điều 7: Thời hạn Hợp đồng. Hợp đồng này có hiệu lực đến hết tháng 12 năm 2004. IBT và RICFC đảm bảo các cá nhân đại diện cho mỗi bên dưới đây có đủ thẩm quyền để tham gia ký kết Hợp đồng này.

Hợp đồng được lập thành 04 bản bằng tiếng Việt có giá trị như nhau. Mỗi bên giữ 02 bản để thi hành.



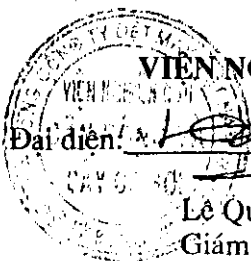
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (IBT)

Đại diện:


Lê Trần Bình
Viện Trưởng

Đại diện


Đinh Thị Phòng
Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật



VIỆN NGHIÊN CỨU CÂY BÔNG VÀ CÂY CỐ SỢI (RICFC)

Đại diện:


Lê Quang Quyền
Giám đốc

Đại diện


Lê Trọng Tinh
Chủ nhiệm Bộ môn Di truyền Giống

Phụ lục 1.

Nguyên liệu IBT chuyển giao cho RICFC:

- a. *Agrobacterium* mang gen mã hoá protein tinh thể độc tố *cryIA(b)*;
- b. *Agrobacterium* mang gen mã hoá protein tinh thể độc tố *cryIA(c)*;
- c. *Agrobacterium* mang gen kháng hạn P5CS.

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN
VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Số: /HDCGNL

HỢP ĐỒNG CHUYỂN GIAO NGUYÊN LIỆU

Hợp đồng này có hiệu lực từ ngày 4 tháng 2 năm 2002 bởi và giữa:

- 1. Bên giao:** Viện Công nghệ Sinh học (IBT), Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc Gia (NCST)
Địa chỉ: 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Điện thoại: 04 7563148
Fax: 04 8363144
Tài khoản: 931.01.064 tại Kho bạc Nhà nước Ba Đình - Hà Nội
Đại diện là: Ông Lê Trần Bình, Viện Trưởng
Giao cho: Bà Đinh Thị Phòng, Cán bộ Nghiên cứu Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật triển khai thực hiện hợp đồng
- 2. Bên nhận:** Viện Di truyền Nông nghiệp (IGA), Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (MARD)
Địa chỉ: Đường Thăng Long, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội
Điện thoại: 04 8363061
Fax: 04 7543196
Tài khoản: 931.01.037 tại Kho bạc Nhà nước Từ Liêm, Hà Nội
Đại diện là: Ông Trần Duy Quý, Viện Trưởng
Giao cho: Ông Vũ Đức Quang, Trưởng Bộ môn Sinh học Phân tử tổ chức thực hiện.

IBT và IGA thoả thuận ký kết Hợp đồng chuyển giao Nguyên liệu (sau đây gọi tắt là Hợp đồng) với các điều khoản sau:

Điều 1: Nguyên liệu. Thuật ngữ “Nguyên liệu” nhằm chỉ vector mang gen ACO antisense do IBT cung cấp cho IGA. Nguyên liệu cũng bao gồm tất cả nguyên liệu di truyền như tế bào, mô, cây, hạt có chứa vector mang gen ACO antisense và các nguyên liệu có nguồn gốc hoặc được cải biến từ vector này cùng các thông tin liên quan.

Điều 2: Chuyển giao Nguyên liệu. IBT sẽ cung cấp Nguyên liệu cho IGA nêu trong Phụ lục 1 kèm theo Hợp đồng này.

Điều 3: Sử dụng Nguyên liệu. Nguyên liệu chỉ được sử dụng cho mục đích nghiên cứu chuyển gen ACO vào cây hoa cúc trong khuôn khổ triển khai thực hiện đề tài nhánh thuộc đề tài cấp Nhà nước KC.04.13 "Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi" giữa IBT và IGA. Qua Hợp đồng này, IBT không đồng ý cho IGA sử dụng Nguyên liệu để sản xuất thương mại cũng như cho các mục đích khác.

Điều 4: Trách nhiệm của IGA.

- a. **Bảo mật.** IBT chỉ cung cấp Nguyên liệu cho những cán bộ nghiên cứu liên quan thuộc Bộ môn Di truyền Phân tử, IGA. IGA có trách nhiệm lưu giữ và bảo mật Nguyên liệu. Nếu không được sự đồng ý của IBT, IGA không công bố hay chuyển giao Nguyên liệu cho bất kỳ bên thứ ba nào khác (kể cả công bố cho các Phòng Ban hay Bộ môn thuộc IGA). Thuật ngữ "Nguyên liệu" trong Điều 4a. không bao gồm các Nguyên liệu: i) đã được công bố rộng rãi; ii) là sản phẩm sở hữu của IGA hoặc IGA nhận được từ nguồn khác; iii) được IBT cho phép công bố bằng văn bản; iv) bắt buộc phải công bố do luật hoặc điều luật Quốc Gia quy định.
- b. **Báo cáo.** IGA có trách nhiệm báo cáo định kỳ sáu (6) tháng/lần cho IBT và một báo cáo tổng kết trước ba mươi (30) ngày, tính từ ngày hết hạn hợp đồng về tình hình và kết quả thực hiện đề tài nhánh này.
- c. **Công trình công bố.** IGA có trách nhiệm cung cấp cho IBT tất cả sản phẩm khoa học có sử dụng Nguyên liệu như bản thảo bài báo, báo cáo hội nghị ít nhất sáu mươi (60) ngày trước ngày công bố. Nếu thấy cần thiết, IBT có quyền tạm dừng công bố các ấn phẩm này để tiến hành các đăng ký sở hữu trí tuệ.

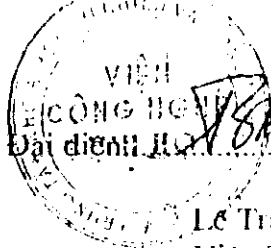
Điều 5: Sử dụng và chuyển nhượng Nguyên liệu. IGA có trách nhiệm sử dụng Nguyên liệu được chuyển giao theo đúng luật và các quy định hiện hành của Việt Nam. IBT không có trách nhiệm đối với bất kỳ rủi ro hoặc thiệt hại phát sinh nào do IGA sử dụng nguyên liệu. IGA có nghĩa vụ hợp tác chặt chẽ và bảo vệ IBT khỏi các ảnh hưởng bất lợi phát sinh do việc sử dụng Nguyên liệu.

Điều 6: Sở hữu Nguyên liệu. Tất cả Nguyên liệu (kể cả các bản sao) là tài sản của IBT. IGA có trách nhiệm hủy bỏ hoặc trả lại toàn bộ Nguyên liệu cho IBT ngay sau khi hết hạn Hợp đồng.

Điều 7: Sở hữu Sáng chế. IBT là chủ sở hữu các sáng chế hoặc phát minh được tạo ra trên cơ sở IGA sử dụng Nguyên liệu của IBT. IBT đồng ý tham gia đàm phán trên tinh thần hợp tác nếu IGA mong muốn sử dụng các sáng chế hoặc phát minh này.

Điều 8: Thời hạn Hợp đồng. Hợp đồng này có hiệu lực đến tháng 10 năm 2002. IBT và IGA đảm bảo các cá nhân đại diện cho mỗi bên dưới đây có đủ thẩm quyền để tham gia ký kết Hợp đồng này.

Hợp đồng này được lập thành 04 bản bằng tiếng Việt có giá trị như nhau. Mỗi bên giữ 02 bản để thi hành.

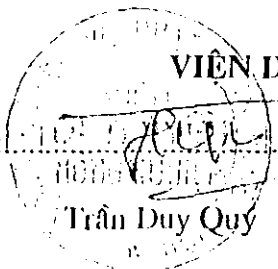


VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (IBT)

Đại diện: _____

Lê Trần Bình
Viện Trưởng

Đinh Thị Phòng
Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật



VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP (IGA)

Đại diện: _____

Trần Duy Quý

Viện Trưởng

Đại diện: _____

Vũ Đức Quang

Trưởng Bộ môn Sinh học Phân tử

Phụ lục 1.

Nguyên liệu IBT chuyển giao cho IGA:

Vector pCAMBIA 2300 mang gen ACO antisense và chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58 chứa vector này.

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

V.KHCNVN
V.CNSH
V.KHCNVN
V.CNSH

V.KHCNVN
V.CNSH

Tóm tắt Khoa học và Kỹ thuật Đề tài

**NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG CÔNG NGHỆ GEN
ĐỂ TẠO CÂY CHUYỂN GEN NÂNG CAO SỨC CHỐNG CHỊU
ĐỐI VỚI SÂU BỆNH VÀ NGOẠI CẢNH BẤT LỢI**

<i>Mã số:</i>	KC.04.13
<i>Chủ nhiệm Đề tài:</i>	PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH
<i>Cơ quan chủ trì:</i>	Viện Công nghệ Sinh học
<i>Cơ quan chủ quản:</i>	Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
<i>Thời gian thực hiện:</i>	10/2001 - 10/2004

Hà Nội, 2/2005

Bản Báo cáo viết xong ngày 1/2/2005

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04.13

5428 TT

26/7/05

MỤC LỤC

LỜI MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC	2
1.1. Tình hình nghiên cứu trong nước	2
1.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	2
1.3. Mục tiêu và nội dung cần thực hiện	2
CHƯƠNG 2. LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	4
2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	4
2.2. Dạng sản phẩm kết quả tạo ra	5
2.3. Nhu cầu kinh tế - xã hội và địa chỉ áp dụng	5
CHƯƠNG 3. NHỮNG NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN	6
3.1. Kết quả phân lập gen	6
3.2. Hoàn thiện các quy trình chuyển gen kháng sâu và gen chịu hạn vào cây bông vải	9
3.3. Kết quả tạo dòng cây hồng chuyển gen kháng sâu	11
3.4. Chuyển gen anti-ACO giữ hoa lâu tàn và gen cryIA(c) kháng sâu vào cây hoa cúc	12
3.5. Kết quả tạo dòng lúa kháng rầy, đạo ôn và kháng sâu bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau	14
3.6. Các phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen	20
3.7. Cơ sở khoa học và quy trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng	24
CHƯƠNG 4. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC	29
4.1. Kết quả về khoa học	29
4.2. Kết quả nổi bật và khả năng áp dụng	30
4.3. Trình độ công nghệ	31
4.4. Khả năng áp dụng	31
4.5. Đào tạo	31
4.6. Sản phẩm khoa học của đề tài	33
4.7. Danh sách các công trình công bố	33
4.8. Hạn chế của đề tài	34
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	35
5.1. Kết luận	35
5.2. Đề nghị	35
TÀI LIỆU THAM KHẢO	36

LỜI MỞ ĐẦU

Các kỹ thuật sinh học truyền thống như kỹ thuật lai tạo và chọn lọc giống đã được con người sử dụng hàng ngàn năm qua để tạo ra các cây trồng có đặc tính nông học thích hợp và riêng biệt. Tuy nhiên những kỹ thuật này đòi hỏi nhiều thời gian và có thể phải trải qua nhiều thế hệ mới có được những tính trạng mong muốn và loại bỏ những tính trạng không mong muốn. Công nghệ sinh học (CNSH) sử dụng kỹ thuật di truyền để biến đổi cây trồng bằng cách đưa trực tiếp những gen có giá trị vào bộ gen của cây nhận và nhanh chóng tạo ra cây trồng biến đổi gen (GMC) mang những đặc tính mong muốn. Hiện nay CNSH hiện đại và các cây trồng GM đang được ứng dụng rộng rãi và đã có những đóng góp đáng kể. Chỉ mới trong thời gian chưa đầy 10 năm, bắt đầu từ 1995 với 0,4 triệu ha cây trồng chuyển gen đầu tiên được gieo trồng, đến năm 2004 đã có đến trên 67 triệu ha cây trồng chuyển gen được trồng trên quy mô toàn cầu. Riêng trong giai đoạn 1986 -1997, trên toàn cầu có tới 25000 thử nghiệm trên đồng ruộng đối với các cây trồng biến đổi di truyền. Các thử nghiệm này tập trung vào 10 loại tính trạng trên đối tượng là 60 loại cây trồng. Phần lớn các quốc gia ở Đông Nam Á cũng đang nhập cuộc.

Ở Việt Nam, lĩnh vực nghiên cứu tạo sinh vật GM đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu. Nhiều gen quý có giá trị như năng suất, chất lượng, chống chịu đã được phân lập và nghiên cứu nhằm chuyển vào cây trồng. Đặc biệt trong Chương trình CNSH giai đoạn 1996 - 2000, Viện CNSH đã thực hiện đề tài cấp nhà nước có nội dung về chuyển gen ở cây trồng trong đó gen *Xa21* kháng bạc lá ở lúa và gen *cry* đã được chuyển thành công vào giống lúa C71. Ngoài ra, trong khuôn khổ các đề án hợp tác trong nước và quốc tế, những vấn đề nghiên cứu tăng cường tính chịu hạn, chịu mặn ở cây lúa, chuyển gen kháng virus xoắn vòng vào cây đu đủ,... đã và đang được triển khai hiệu quả.

Xuất phát từ những cơ sở nghiên cứu trên, trong chương trình Khoa học Công nghệ cấp Nhà nước KC.04, Viện CNSH phối hợp cùng với một số Viện nghiên cứu khác tiến hành đề tài KC.04.13 "***Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi***".

CHƯƠNG 1.

TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

CNSH đã góp phần nâng cao hiệu quả của sản xuất và đáp ứng nhu cầu của đời sống con người, riêng trong lĩnh vực nông nghiệp, sinh vật chuyển gen (GMO) cho năng suất cao, đem lại lợi ích cho người sản xuất là điều đã được khẳng định qua khoa học và thực tiễn. Ở nước ta, đã có các dự án nghiên cứu CNSH được hỗ trợ từ các Chính phủ và tổ chức quốc tế. Những dự án này liên quan đến nhiều cây trồng quan trọng của Việt Nam như bông, hoa và cây rừng. Một số phòng thí nghiệm đã và đang được nhà nước đầu tư bước đầu và có điều kiện gửi các cán bộ đi thực tập ở những phòng thí nghiệm tiên tiến của nước ngoài. Do vậy, đã làm chủ được các kỹ thuật cơ bản như phân lập và xác định trình tự gen, thiết kế và biến nạp gen vào tế bào vi sinh vật, động vật, thực vật, nghiên cứu biểu hiện gen,...

Các nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng đang được triển khai nghiên cứu và ứng dụng chủ yếu tại các phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Sinh học Nhiệt đới (thuộc Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam), Viện Di truyền Nông nghiệp và Viện Nghiên cứu Lúa đồng bằng sông Cửu Long (thuộc Bộ NN & PTNT). Viện Công nghệ Sinh học đã đào tạo được đội ngũ cán bộ, thu thập và phân lập được hàng chục loại gen quý có giá trị. Trong chương trình KHCN-02 (1996-2000), Viện Công nghệ Sinh học đã thực hiện đề tài chuyển gen *Xa21* và gen *cry* vào cây lúa. Trước đó, Viện đã tham gia thực hiện đề án INCO18 với Bỉ, Pháp, Tây Ban Nha và Trung Quốc về tăng cường tính chịu hạn và chịu mặn ở cây lúa bằng công nghệ chuyển gen, được sự hỗ trợ của ISAAA, tiến hành chuyển gen kháng virus xoắn vòng ở cây đu đủ. Tuy nhiên, tất cả các cây trồng chuyển gen được tạo ra ở Việt Nam mới chỉ tồn tại ở quy mô thí nghiệm và chờ thử nghiệm. Hiện nay, chúng ta chưa có quy chế cho việc tiến hành thử nghiệm các cây trồng này ở ngoài đồng ruộng do chúng ta chưa có văn bản pháp lý thống nhất trên cả nước.

1.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Năm 1984, trên thế giới đã có một số nghiên cứu thành công khi chuyển gen vào cây trồng. Đến nay, vấn đề cải biến giống cây trồng đã phát triển vượt bậc. Riêng trong giai đoạn 1986 -1997, có tới 25.000 thử nghiệm trên đồng ruộng tập trung vào 10 loại tính trạng trên đối tượng là 60 loại cây trồng đã được tiến hành.

Diện tích trồng cây chuyển gen toàn cầu năm 2003 là 67,7 triệu ha thu hút khoảng 7 triệu nông dân ở 18 nước, trong đó 5 quốc gia chính là Mỹ (48,2 triệu ha), Argentina (13,9 triệu ha), Canada (4,4 triệu ha), Brazil (3 triệu ha) và Trung Quốc (2,8 triệu ha).

Thương mại hóa các sinh vật GM trong nông nghiệp tập trung chủ yếu vào các cây trồng chính như đậu tương (36,5 triệu ha), ngô (12,4 triệu ha), bông (6,8 triệu ha), và cải dầu (3 triệu ha). Trong đó, hai tính trạng được tập trung chuyển gen nhiều nhất là kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng.

1.3. Mục tiêu và nội dung cần thực hiện

Mục tiêu: Tạo ra các quy trình phân lập và chuyển gen đối với các loại cây trồng khác nhau nhằm đưa công nghệ di truyền vào việc hình thành bộ sưu tập gen, tạo ra các dòng cây mang gen chuyển và quy trình đánh giá chúng trước khi đưa vào sử dụng cho việc tăng cường tính chống chịu ở cây trồng.

Phân lập và thiết kế gen: Đối với hoàn cảnh nước ta, để có thể làm chủ các nguồn gen có giá trị, việc tiếp tục phân lập gen là một yêu cầu tiên quyết để phát triển và ứng dụng công nghệ chuyển gen vào công tác cải tiến giống cây trồng. Viện Công nghệ Sinh học (Viện CNSH) đã tiếp nhận và thiết kế lại các gen *cryIA(b,c)*, gen *bar*, gen *chitinase* và tiến hành phân lập thành công nhóm gen *ACO antisense* (Nguyễn Huy Hoàng và CS.),

gen Pi kháng bệnh đạo ôn ở lúa, đặc biệt là nhóm gen *vip* mã hoá loại protein độc đối với côn trùng thuộc họ Coleoptera (Cánh cứng). Các nhóm gen này đã được ưu tiên chuyển nạp vào một số loại cây (không làm lương thực và thực phẩm) nhằm nâng cao tính chống chịu đối với sâu, bệnh (nấm, vi khuẩn và virus).

Hoàn thiện các quy trình chuyển gen: Đối với cây bông đề tài đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh cây bằng nuôi cấy mô mở ra khả năng chuyển gen thông qua *Agrobacterium*, đồng thời hoàn chỉnh phương pháp chuyển gen qua ống phấn ở hầu hết các giống bông vải đang trong cơ cấu giống sản xuất đại trà (Nội dung hợp tác của Viện CNSH với Viện Nghiên cứu Cây bông và cây có sợi (Viện NCCB Nha Hồ). Trên đối tượng cây hoa cúc, đề tài đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh và chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR và lai Southern cho thấy nhóm tác giả đã thu được 14 cây hoa cúc mang gen *anti-ACO* và 20 cây mang gen kháng sâu *cryIA(c)* (Nội dung hợp tác giữa Viện CNSH và Viện Di truyền Nông nghiệp). Trên đối tượng cây hồng (Paulownia), đã nhận được 5 cây Hồng chuyển gen kháng sâu biểu hiện qua kết quả lai Southern, Western và biotest dương tính (Nội dung kết hợp với Viện Sinh học nhiệt đới). Đặc biệt trên đối tượng là cây lúa, đã xây dựng thành công hệ thống chuyển gen bằng phương pháp bắn gen và thông qua *A. tumefaciens* ở một số giống lúa *indica* và đã nhận được các dòng chuyển gen thế hệ T_1 , T_2 cho tỷ lệ kháng sâu cao tới 100%. Nổi bật đối với cây lúa là đã sử dụng hệ thống chọn lọc bằng mannose thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hoặc thuốc trừ cỏ (Nội dung hợp tác với Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long) nhằm đưa ra hệ thống chuyển gen sạch, giải quyết triệt để những lo ngại về tính an toàn của cây trồng biến đổi gen.

Đánh giá an toàn GMC: Bên cạnh đó đề tài đã xây dựng được một số định hướng về phương pháp đánh giá an toàn sinh học cho cây chuyển gen kháng sâu ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô nhà lưới, nhằm mục đích đánh giá an toàn sinh học 2 - 3 dòng cây chuyển gen có triển vọng được trồng thử trên đồng ruộng có kiểm soát nhằm tìm hiểu kết quả chuyển gen và ảnh hưởng của cây chuyển gen lên môi trường sinh thái và khả năng phát tán tự nhiên của gen chuyển. Thử khả năng gây dị ứng của protein lạ do chuyển gen tạo ra nếu có.

Thử nghiệm GMC: Cùng với việc tạo cây chuyển gen trong phòng thí nghiệm và trồng thử nghiệm ngoài nhà lưới, đề tài đã xây dựng thành công các quy trình kỹ thuật giám sát cây trồng chuyển gen và sản phẩm của chúng góp phần tạo hàng rào kỹ thuật cho vấn đề sinh vật chuyển gen (GMO).

Tóm lại, đề tài KC04-13 không những sẽ có những đóng góp khoa học cho nghiên cứu và phát triển lĩnh vực tạo giống cây trồng bằng công nghệ sinh học hiện đại mà còn góp phần chuẩn bị các mặt cơ sở khoa học, kỹ thuật và văn bản pháp lý cho công tác quản lý và triển khai loại sản phẩm mới đang gây nhiều tranh luận trong nước và trên thế giới.

CHƯƠNG 2.

LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

Các giống cây trồng thuộc các nhóm: (1) *Giống bông vải* gồm các giống TM1, VN36P, 254, SB1, C118, SSR, Cooker và các dòng bông kháng sâu do Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi Nha Hố, Ninh Thuận cung cấp; (2) *Cây trồng rừng*: chỉ có cây hồng được chọn vì dễ bị sâu ăn lá phá hoại; (3) *Cây cảnh* là hoa cúc được nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. (4) *Cây lương thực*: gồm các giống lúa *indica* (IR64, KDML105, C71) và các dòng Taipei 309.

Các loại sinh phẩm, vật tư và hoá chất: (1) Bộ sưu tập các gen và các chủng *Agrobacterium* có nguồn gốc quốc tế được chuyển giao cho Viện Công nghệ Sinh học thông qua MTA; (2) *Chủng Bt AB51* có tính kháng sâu non bộ hà đã được Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện CNSH sàng lọc. (3) Các kháng thể kháng protein Cry, Vip2,3 có nguồn gốc từ ICgeb, New Delhi và Viện Công nghệ Sinh học sản xuất. (4) Các primer được tổng hợp dựa trên trình tự các gen nghiên cứu.

2.1.2. Phương pháp

2.1.2.1. Phương pháp phân lập gen

- (i) Phân lập thông qua chức năng protein
- (ii) Phân lập gen dựa trên nhân bản bằng PCR

2.1.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây trồng

- Chuyển gen thông qua *Agrobacterium* đối với lúa, hồng, hoa cúc, bông.
- Chuyển gen bằng súng bắn gen ở cây lúa
- Chuyển gen qua ống phần ở cây bông

2.1.2.3. Phương pháp đánh giá cây chuyển gen

- Tiến hành sàng lọc cây chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh chọn lọc.
- Sàng lọc cây chuyển gen bằng phản ứng PCR gen chuyển.
- Lai Southern giữa mẫu DNA dò với DNA genom cây chuyển gen để xác định số lượng bản gen chuyển trong genom cây nhận.
- Lai Northern giữa mẫu dò với RNA cây chuyển gen.
- Lai Western giữa protein cây chuyển gen với kháng thể đặc hiệu.
- Trồng cây thu hạt đối với cây nhân giống bằng hạt, thử kháng sinh để đánh giá mức độ đồng hợp tử của gen chuyển.

2.1.2.4. Phương pháp thử nghiệm trên đồng ruộng và đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen

- Đánh giá hoạt tính gen chuyển bằng phép thử sinh học về tính kháng sâu, kháng bệnh.

2.2. Dạng sản phẩm kết quả tạo ra

- Có bộ sưu tập các gen có giá trị dùng để chuyển vào cây trồng như *cryIA(b,c)*, *anti-ACO*, *GNA*, *Xa21*, *TPS*, *P5CS*, *nhaA*, *oat*.
- Các dòng cây chuyển gen có giá trị làm giống hoặc sử dụng làm nguyên liệu lai hữu tính tiếp theo.
- Quy trình kỹ thuật chuyển gen vào cây trồng thông qua *Agrobacterium* và vi tiêm.
- Quy trình kỹ thuật chuyển gen vào cây trồng sử dụng vector chọn lọc tích cực không dùng gen kháng kháng sinh.
- Các phương pháp phân lập và thiết kế gen đạt trình độ quốc tế.
- Quy phạm đánh giá cây chuyển gen gồm các bước trong phòng thí nghiệm và trong nhà lưới an toàn.

2.3. Nhu cầu kinh tế - xã hội và địa chỉ áp dụng

Tạo được những quy trình kỹ thuật nền về chuyển gen ở cây trồng, các quy phạm cơ bản về đánh giá cây trồng chuyển gen góp phần phát triển lĩnh vực khoa học tạo giống và năng lực quản lý nhà nước về an toàn sinh học đối với sinh vật chuyển gen.

Góp phần rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả công tác tạo giống cây trồng, giảm chi phí bảo vệ thực vật, hạ giá thành nông sản, tăng thu nhập cho người nông dân.

Đa dạng hoá sản phẩm, kéo dài tuổi thọ sản phẩm, mở rộng thị trường (hoa tươi, quả nhiệt đới), tạo thêm công việc cho nông dân, góp phần chuyển dịch cơ cấu trong sản xuất nông nghiệp.

Đưa nước ta hội nhập bình đẳng vào trào lưu phát triển nông nghiệp công nghệ cao của khu vực và thế giới.

CHƯƠNG 3. NHỮNG NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN

3.1. Kết quả phân lập gen

3.1.1. Kết quả phân lập gen *vip*

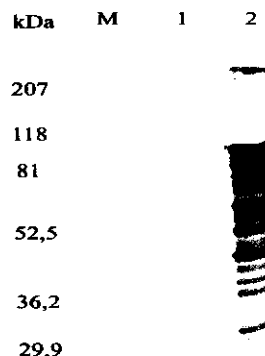
Gen *vip* mã hoá các protein sinh ra trong pha sinh dưỡng trong chu trình phát triển của vi khuẩn Bt và Bc có hoạt lực diệt côn trùng và có phổ tác dụng mạnh hơn các protein độc do gen *cry* mã hóa (Juan & CS, 1996).

3.1.1.1. Phát hiện protein Vip2, Vip3 bằng lai miễn dịch

Kết quả thu được bằng protein khoảng 89 kDa (hình 1) xuất hiện ở mẫu protein đối chứng dương còn ở mẫu protein dịch nổi ở chủng BtAB.51 thấy xuất hiện 1 vạch đặc hiệu nhưng với kích thước nhỏ hơn khoảng 86kDa. Tuy nhiên theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi thì phân đoạn có hoạt tính diệt sâu non bọ hà khoai lang có kích thước ~ 44 kDa và có biểu hiện dương tính với kháng thể kháng protein Vip2. Như vậy, phổ diệt sâu của protein quan tâm này khác với phổ diệt sâu của protein Vip3 vì nó có khả năng tiêu diệt sâu non bọ hà thuộc Bộ Cánh cứng. Trong khi theo công bố của Juan và CS, protein Vip3A có khả năng diệt rất nhiều loại sâu đặc biệt là sâu thuộc Bộ Cánh vảy và Hai cánh (Juan & CS, 1996).



Hình 1. Kết quả phản ứng lai miễn dịch với kháng thể kháng protein Vip2
Đường chạy số 1: Marker; Đường chạy số 4: Thang protein chuẩn; Đường chạy số 5: Phản ứng Western-Blotting của protein dịch nổi BtAB75; Đường chạy số 7: Phản ứng Western-Blotting của protein



Hình 2. Kết quả phản ứng Western-Blotting của protein Vip3 với kháng thể kháng Vip3
M: Thang protein chuẩn; Đường chạy số 1: Phản ứng Western-Blotting của protein dịch nổi BtAB51; Đường chạy số 2: Phản ứng Western-Blotting của protein Vip3 với kháng thể kháng Vip3

3.1.1.2. Kết quả tinh chế protein Vip2

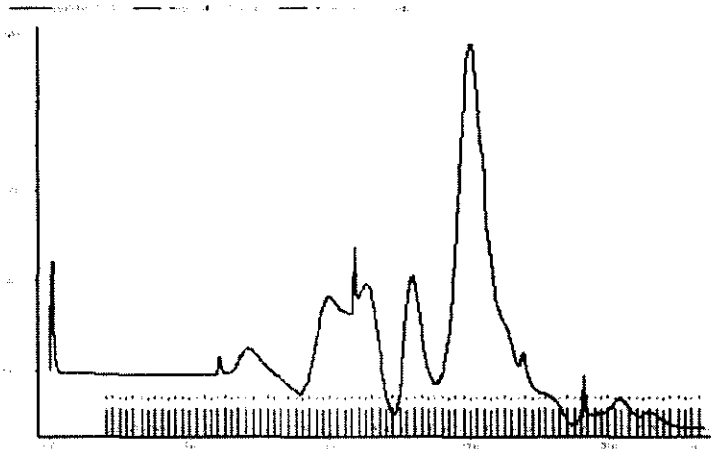
Protein ngoại bào sau khi đã được tách chiết và rửa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà được thẩm tích loại muối, lọc qua màng lọc và được nạp thẳng vào cột Resource_Q_1_ml trên hệ FPLC (Pharmacia-Biotech). Các tạp chất được rửa bằng đệm Tris 50 mM pH 7,4 cho đến khi A595 trở lại đường nền và protein được thổi ra khỏi cột bằng gradient nồng độ 0-0,5M NaCl. Các phân đoạn protein thu được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Phổ sắc kí được thể hiện trên hình 3.

Protein tinh chế có hoạt lực diệt sâu và có ngưỡng gây chết nằm trong khoảng 200 ng/ 200 μ l thức ăn.

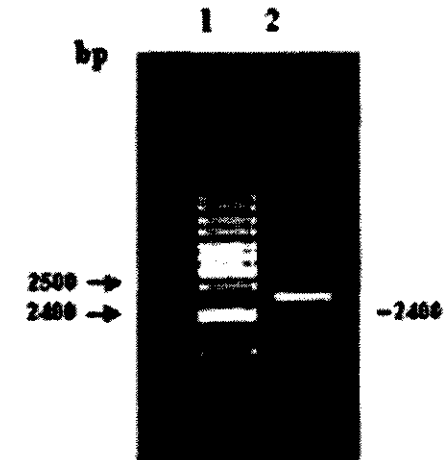
3.1.1.3. Phân lập gen *vip3* và thiết kế vector chuyển gen

Sử dụng kỹ thuật PCR đã xác định sự có mặt và nhân bản được gen *vip3* với ADN khuôn chính là ADN tổng số của chủng Bt AB51. Dựa vào trình tự gen *vip3A* được Wu & CS công bố (mã số AY295778), chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu V2.1 và V2.2 để nhân gen *vip3*. Kết quả điện di (H. 4) trên cho thấy đoạn ADN mã hóa protein Vip3 đã được nhân lên một cách đặc hiệu. Sản phẩm PCR được ghép vào pCR[®]2.1-TOPO.

Kết quả điện di sản phẩm cắt ở hình 4 cho thấy các plasmid tái tổ hợp được tách từ khuẩn lạc trắng sau khi được cắt bằng *EcoRI* cho ra 2 băng ADN có kích thước khác nhau. Băng ở phía trên nằm ngang bằng với plasmid tách từ khuẩn lạc xanh cũng được cắt với enzym *EcoRI*. Băng ở phía dưới có kích thước khoảng 2400bp, tương đương với kích thước sản phẩm PCR của gen *vip3*.

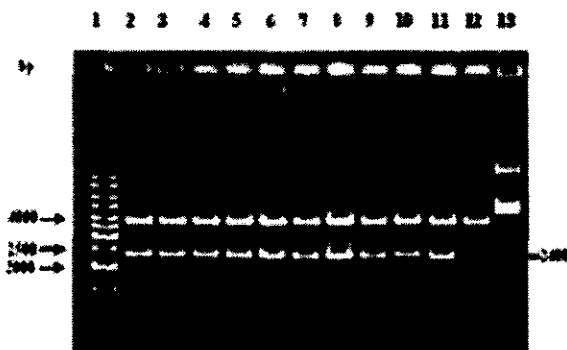


Hình 3. Sắc kí đồ lọc gel mẫu protein ngoại bào BtAB51 từ cột Superose 12 trên hệ FPLC

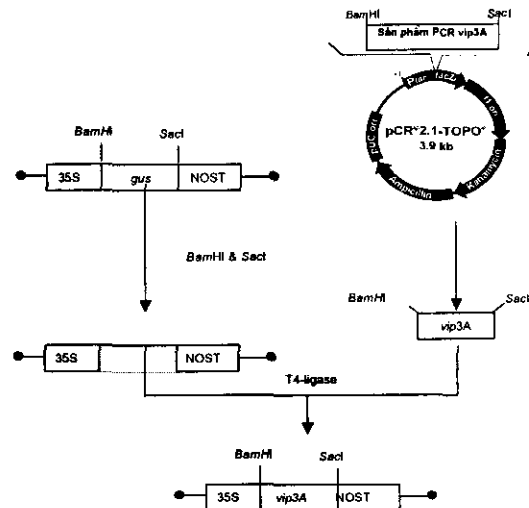


Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *vip3*: 1: Marker 1Kb; 2: Sản phẩm PCR gen mã hoá protein Vip3

Trình tự 3 mẫu trong số các mẫu plasmid tách từ khuẩn lạc trắng (ký hiệu V13, V14, V15) (H. 5) được làm nguyên liệu cho phản ứng PCR xác định trình tự gen *vip3* theo cả chiều xuôi và chiều ngược. Với các kết quả đọc trình tự, chúng tôi sử dụng phần mềm DNASTar để so sánh các trình tự V13, V14, V15 với nhau và với trình tự gen *vip3* đã được công bố trong ngân hàng gen quốc tế và nhận thấy trình tự gen *vip3* ở dòng V15 ít sai khác nhất so với trình tự WU và CS đã công bố.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid bằng *EcoRI*: 1: Marker 1Kb; 2-11: Các plasmid tách từ khuẩn lạc trắng được cắt bằng *EcoRI*; 12: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh được cắt bằng *EcoRI*; số 13: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng đối chứng không cắt của mẫu số 2



Hình 6. Sơ đồ thiết kế vector 35S/vip3A/NOST

Gen *vip3* có kích thước 2369bp, mã hoá 793 axit amin, trong đó đoạn gen có nghĩa bắt đầu bằng mã ATG của Methionin từ nucleotit thứ 9 và kết thúc bằng mã TAA ở nucleotit thứ 2378. Trình tự nhận biết của *BamHI* nằm ngay đầu gen và trình tự nhận biết của *SacI* nằm ở cuối gen. So sánh với trình tự gen *vip3A* được Wu và CS công bố trong ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi nhận thấy ở gen *vip3* chúng tôi phân lập được xuất hiện một đột biến thay thế Adenin bằng Guanin ở vị trí 1360 kéo theo sự thay thế axit Aspartic bằng Glycin trong trình tự axit amin của protein tương ứng.

Vector pBI121 có kích thước 13kb, được thiết kế dựa trên cấu trúc của vector pBIN19, là một vector chuyển gen vào thực vật. pBI121 mang một vị trí cắt duy nhất của *Bam*HI và *Sac*I ở hai đầu gen *gus* (β -Glucoronidase gene = gen mã hóa cho β -Glucoronidase).

Plasmid tái tổ hợp ở dòng V15 cũng có vị trí cắt duy nhất của hai enzym *Bam*HI và *Sac*I nên chúng tôi tiến hành cắt đồng thời vector pBI121 và plasmid tái tổ hợp tách từ dòng V15 bằng *Bam*HI và *Sac*I. Như vậy đã thiết kế thành công được vector chuyển gen pBI121 mang cấu trúc 35s/*vip*3/NOST (H.6).

3.1.2. Xây dựng thư viện gen từ chủng *Bt*. AB.51

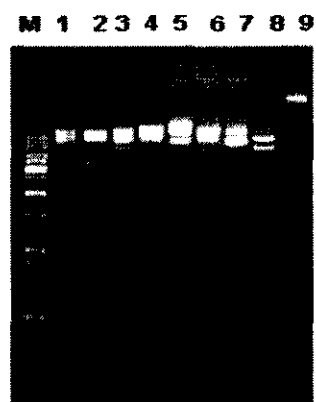
Chủng *Bacillus thuringiensis* AB.51 đã được phòng Công nghệ Tế bào Thực vật sàng lọc và khẳng định có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang.

Tách chiết ADN tổng số của *Bt*, sau đó xử lý với enzym cắt hạn chế *Sau*3A và ghép nối các đoạn gen với vector SuperCos1 để tạo thư viện genomic. Thư viện được khuếch đại và cất giữ ở -80°C .

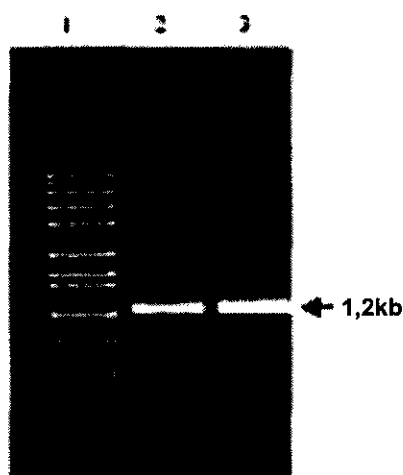
Đánh giá mức đa dạng của thư viện gen thông qua cắt hạn chế 8 dòng bằng *Eco*RI. Kết quả điện di trên hình thấy các dòng đều xuất hiện 2 băng khác nhau, trong đó một băng có kích thước khoảng 7,9kb là vector, đoạn còn lại có kích thước dài ngắn khác nhau (H.7), chứng tỏ thư viện đảm bảo chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn dùng cho việc sàng lọc tìm kiếm gen tiếp theo.

3.1.3. Kết quả về phân lập gen *Pi-2(t)* kháng bệnh đạo ôn

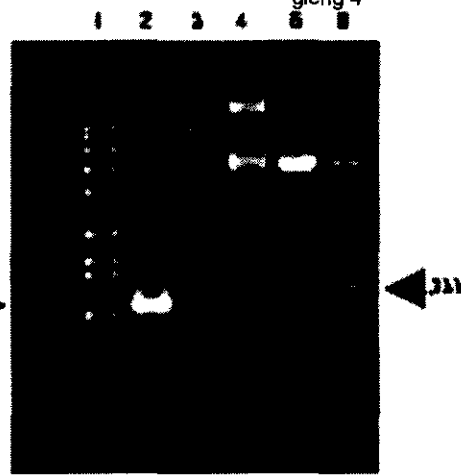
Đối với cây lúa thì một trong những bệnh có sức tàn phá mạnh nhất là bệnh đạo ôn. Bệnh này do nấm *Pyricularia oryzae* gây ra. Theo ước tính của FAO, thiệt hại do bệnh này gây ra làm giảm năng suất lúa trung bình từ 0.7-17.5%. Những nơi bị bệnh nặng có thể bị giảm tới 80%.



Hình 7. Kết quả cắt ADN vector tái tổ hợp: Giếng 1: Marker, Giếng 2-9: ADN vector tái tổ hợp được cắt bằng *Eco*RI, Giếng 10: ADN vector tái tổ hợp đối chứng không cắt của mẫu giếng 4



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi RG64 1: Marker; 2,3: Sản phẩm PCR1.



Hình 9. Điện di kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp cắt bằng enzym giới hạn *Eco*RI 1: Marker; 2: Sản phẩm PCR trước khi gắn vào vectơ; 3: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh; 4: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng; 5: Plasmid tách từ khuẩn lạc xanh cắt bằng *Eco*RI; 6: Plasmid tách từ khuẩn lạc trắng cắt bằng enzym *Eco*RI

Một số lượng lớn gen kháng đạo ôn đã được lập bản đồ dựa trên các chỉ thị phân tử như: *Pi1(t)*, *Pi2(t)*, *Pi4(t)*, *Pi5(t)*, *Pi6(t)*, *Pi9(t)*, *Pi10(t)* và *Pi11(t)* (Causse và CS., 1994), *Pi5(t)* và *Pi7(t)* (Wang và CS, 1994) *Pia*, *Pib*, *Pik*, *Pit*, *Pita*, *Pi12(t)*, *Pi17(t)*, *Pi18(t)*, *Pi19(t)*, *Pi20(t)*, *Pi23(t)*, *Pi62(t)* và *Pi157(t)* (Nagato và Yoshomura, 1998), *Pitq1*, *Pitq5*, *Pitq6* và *Pilm2* (Tabien và CS, 2000), *Pi21(t)* (Fukuoka và CS, 2001).

Kết quả phân lập gen *Pi-2(t)*: Mẫu ADN tổng số của giống lúa C101A51 được dùng làm khuôn trong

phản ứng PCR với cặp mồi RG64F/RG64R của đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố. Sản phẩm PCR hoàn thành được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% có kích thước 1,2kb (H.8). Sau khi gắn sản phẩm PCR vào vectơ pCR⁺2.1. Kết quả tách chiết và cắt kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp được tiến hành kênh số 6 cho ra hai băng: một băng có kích thước tương ứng với kích thước của vectơ pCR⁺2.1; một băng có kích thước 1,2kb đúng bằng với kích thước của băng sản phẩm PCR. Kết quả này cho phép ta khẳng định sản phẩm PCR đã được gắn vào vectơ pCR⁺2.1 (H. 9). Những plasmid mang gen *Pi-2(t)* của giống lúa C101A51 đã được tách với số lượng lớn để xác định trình tự nucleotit và so sánh với trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-2(t)* đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế bằng chương trình phần mềm CLUSTAL W1.81. Kết quả phân tích trình tự nucleotit của sản phẩm mà chúng tôi thu được sau phản ứng PCR so với trình tự mà các tác giả đã công bố trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế có độ tương đồng cao (99,35%).

3.1.4. Kết quả phân lập gen *Pi-1(t)* kháng đạo ôn

Tương tự như phương pháp phân lập gen *Pi-2t* trên và dựa vào dấu phân tử RZ536 liên kết chặt với gen kháng đạo ôn *Pi-1*, chúng tôi đã sử dụng cặp mồi RZ536F/RZ536R để nhân đoạn gen kháng đạo ôn *Pi-1* có kích thước 234 bp. Sau đó, đoạn gen này được tách dòng bằng vectơ tách dòng pCR⁺2.1. TOPO⁺ và sau đó được phân tích trên máy xác định trình tự nucleotide tự động (3100 - Avant Genetic Analyser) với bộ kit của hãng Applied science. Kết quả đọc trình tự gen *Pi-1* và so sánh với các trình tự đã công bố cho thấy có độ tương đồng cao (99,15%) được thể hiện ở hình 10.

C101Lac Tetep	ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGNNNAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGN ATAGGAGGAGGAGGGCAAGGAGAAAAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGA *****
C101Lac Tetep	NNCGACCCTGTTGCCAAGAACTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT CCCGACCCTGTTGCCAAGAACTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTT *****
C101Lac Tetep	TANNNCTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAAATTATTTCTCCTTTTATGTTT TAAAACTTTTAAGCAGGCCGGCTTGACGCTTGCTATTAAATTATTTCTCCTTTTATGTTT ** *****
C101Lac Tetep	TCTCTTTGTTCTGTGTATCAGATCGCGCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT TCTCTTTGTTCTGTGTAGNNGATCGCCCCAAGCCATAGCTGGGCATGACAAGT *****

Hình 10. Trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-1* từ giống lúa Tê tép so với trình tự nucleotit trong Ngân hàng Dữ liệu Gen Quốc tế (C101Lac)

3.2. Hoàn thiện các quy trình chuyển gen kháng sâu và gen chịu hạn vào Cây bông vải

Cây bông vải (*Gossypium hirsutum* L.) là nguồn cung cấp sợi may mặc quan trọng. Song năm 2000, Việt Nam mới chỉ sản xuất được 8 ngàn tấn, đáp ứng được 10% nhu cầu. Theo chương trình phát triển ngành dệt may, Việt Nam đến năm 2005 phải sản xuất 150.000 tấn sợi các loại và đến năm 2010 chỉ tiêu đó là 300.000 tấn. Nguyên nhân làm sản lượng thấp chủ yếu là bông bị sâu bệnh và hạn hán. Vì thế, một trong những chiến lược để tăng sản lượng bông là tạo ra những giống bông có khả năng kháng sâu và chịu hạn. Chuyển gen là một phương pháp để tạo ra những giống bông như vậy.

3.2.1. Hoàn thiện hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây bông *in vitro*

a) Tái sinh cây bông bằng phương pháp tạo đa chồi

Các hạt bông sau khi đã bóc vỏ cứng được khử trùng bề mặt, đặt lên các môi trường cảm ứng mô sẹo C1-C20. Sau 10 ngày, đỉnh chồi của phôi được cắt với độ dài trung bình 2 mm và cấy lên các môi trường S1-S5 để tạo cụm chồi. Các cụm chồi được cấy chuyển lên các môi trường kéo dài chồi (E0-E2). Chồi cao khoảng 2-4 cm, thì được kích thích tạo rễ trên các môi trường R1-R2. Cây con cao hơn 3 cm được trồng trên đất để thu được cây tái sinh (H.11). Hiện nay đã thử nghiệm thành công quy trình tạo đa chồi ở các giống LRA, VN36P, C118, D16-2, TM1, SSR, Cooker, SB1. Các kết quả cho thấy không có sự sai khác rõ rệt giữa các giống.

b) Tái sinh cây bông qua phôi soma

Hạt bông sau khi tách sợi được lột bỏ lớp lông ngắn bằng H_2SO_4 đậm đặc, khử trùng bề mặt và cấy lên môi trường cơ bản MS0. Khi cây non được 10-15 ngày tuổi thì bắt đầu tiến hành tạo mô sẹo từ các đoạn thân mầm dài 1cm và mẫu lá mầm diện tích khoảng $16mm^2$. Sau 4 tuần, chuyển mô sẹo lên môi trường loại bỏ hoàn toàn chất điều khiển sinh trưởng nhưng có chất kích thích tạo phôi là tổ hợp Zea và NAA. Mặc dù quá trình hình thành và phát triển mô sẹo của cả 7 giống là như nhau, sự hình thành phôi chỉ được quan sát thấy ở giống SSR60F và giống Coker 310, là hai giống có khả năng tái sinh cao. Tỷ lệ ra cây của cây tái sinh bình thường là 90%. Kết quả mở ra triển vọng cho phép chuyển gen thông qua *Agrobacterium* hoặc súng bắn gen (H.12).



Hình 11. Quá trình tạo đa chồi từ phôi: a: Phôi b: Đỉnh chồi c: Cụm chồi sau khi cấy chuyển



Hình 12. Tái sinh cây bông giống SSR qua giai đoạn mô sẹo: A. Cây bông gieo hạt sau 7 ngày; B. Đoạn thân trên môi trường tạo mô sẹo; C. Mô sẹo hình thành; D. Mô sẹo chất lượng kém; E. Mô sẹo có khả năng tạo phôi; F. Mô sẹo đã phân hoá phôi; G, H, I. Phôi nảy mầm; K. Cây phát triển từ phôi soma; L. Cây hoàn chỉnh từ phôi soma

3.2.2. Xây dựng quy trình chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm

Các giống bông TM1, D16-2, LRA, C118, VN36P và 254 và MUC9 nhận gen kháng sâu và 3 giống TM1, CS95 và SH4 nhận gen chịu hạn.

Thí nghiệm được thực hiện quy mô nhỏ tại nhà lưới của Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội. Sau đó triển khai thí nghiệm chuyển gen quy mô lớn tại Viện NC Cây Bông và cây có sợi Nha Hố, Ninh Thuận. Cây bông được gieo trồng, chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh theo quy trình sản xuất của ngành trồng bông.

Chọn hoa vừa nở ngày hôm trước, vật bỏ cánh hoa và phần vòi nhụy sát bầu hoa (Hình 13). Dùng kim (loại micropipet dung tích $10\mu l$) hút dung dịch ADN đã pha (tuyệt đối không để bọt khí trong xi lanh) tiêm vào bầu hoa (Hình 14), sau khi tiêm xong, nhỏ 1-2 giọt dung dịch khử trùng và giữ đậu quả lên vết tiêm, buộc dây và biển đánh dấu. Quả sau tiêm đôi lúc không phát triển đều các múi (Hình 15). Khi quả nở, tiến hành thu hoạch theo từng công thức, cán tách xơ, đưa vào bảo quản hạt T₀ ở kho lạnh.

Tổng số hoa đã tiêm được là 25.442, tổng số quả đậu là 18.737 quả. Như vậy, tỷ lệ đậu quả trung bình khá cao (73,6%), kém không đáng kể so với đối chứng thụ phấn bình thường (78,3%). Trên các công thức, tỷ lệ đậu quả biến động từ 61,1 đến 82,1%, không chênh lệch nhau nhiều giữa các giống trên cùng nồng độ

(trung bình 70,8-75,5%) và giữa các nồng độ trên cùng một giống (trung bình 70,0 - 79,1%). Trong đó, số hạt tiêm chuyển gen kháng sâu là 212.763 hạt/5 giống và tiêm chuyển gen chịu hạn là 4.000 hạt/3 giống.

Sàng lọc: Hạt bông loại bỏ hạt lép, sâu bệnh, sau đó gieo trực tiếp trên nền giá thể (đất, cát, trấu) theo từng hàng. Khi cây con đạt 2 lá thật, tiến hành thử kháng sinh trên lá với nồng độ kanamycine 500mg/L hoặc hygromycine 75mg/L (Hình 16). Tỷ lệ cây kháng ở cả 3 giống D16-2, MCU9 và VN36P tương ứng là 10,3; 2,7 và 60,8%, cao hơn nhiều so với các kết quả nghiên cứu đã công bố trước đây của các tác giả Trung Quốc (0,1 - 0,2%).

Trên môi trường có kháng sinh chọn lọc, những cây bông có khả năng ra rễ được lấy ra loại bỏ 2 lá mầm, loại bỏ phần gốc đen, cấy sang môi trường kháng sinh mới. Cứ hai tuần cấy chuyển một lần. Sau hai lần cấy chuyển những cây sống sót và tiếp tục ra rễ được chuyển sang môi trường nhân cây. Cây phát triển tốt tiến hành thu lá, tách ADN, chạy PCR để chọn lọc cây mang gen. Đã chọn được một số dòng bông của các giống D16-2, LRA, 254 sau 3 lần cấy chuyển trên môi trường chọn lọc: D16-2: 2 dòng (tổng số có 5 cây); LRA: 1 dòng (tổng số có 1 cây) và 254: 5 dòng (tổng số có 16 cây) (H.17).

Các dòng bông này được chúng tôi tách chiết ADN và kiểm tra sự có mặt của gen đã chuyển vào bằng kỹ thuật PCR và đã thu được 6 cây thuộc giống 254 có phản ứng dương tính.



Hình 13. Bầu nhụy sau khi vật cánh hoa và cắt vòi nhụy



Hình 14. Đưa kim tiêm và bầu nhụy và tiêm dung dịch ADN



Hình 15. Quả bông sau tiêm



Hình 16. Thử tính kháng Hygromycin trên lá



Hình 17. Kết quả PCR các dòng bông chuyển gen giống 254

3.3. Kết quả tạo dòng cây hồng chuyển gen kháng sâu

Cây hồng (*Paulownia*) là cây chống chịu khô hạn, giữ đất tốt và có giá trị kinh tế cao nhờ gỗ chắc, có vân đẹp, ít bị biến dạng bởi thời tiết, trong đó đặc điểm nổi bật là sinh trưởng rất nhanh. Tuy nhiên, lá cây lại rất lớn, tỷ lệ đạm cao có thể dùng làm thức ăn gia súc nên thường hay bị các côn trùng phá hoại làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây. Để tạo được cây hồng có tính kháng sâu cao, chúng tôi dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để tiến hành chuyển gen kháng sâu vào cây.

Sử dụng giống cây hồng (*Paulownia fortunei*) nuôi trong ống nghiệm làm nguyên liệu cho việc xây dựng hệ thống tái sinh cây hồng: (1) Tái sinh từ mảnh lá; (2) Tái sinh từ cuống lá; (3) Tái sinh từ thân cây; (4) Tái sinh bằng phương pháp cắt lớp mỏng tế bào. Nồng độ chất chọn lọc phosphinothricin (PPT) được xác định là 2mg/l (H.18). Phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 chứa plasmid ITB mang gen *cryIA(c)* (gen kháng sâu), gen *bar* (gen kháng thuốc trừ cỏ Basta) và gen *gusA* (gen chỉ thị).

Kiểm tra gen chỉ thị *gusA* bằng dung dịch X-Gluc: bằng cách ngâm các mảnh lá và chồi nhỏ với dung dịch X-Gluc khoảng 15 giờ ở 37°C, mẫu chuyển gen sẽ có màu xanh chàm đặc trưng, còn mẫu đối chứng sẽ không chuyển màu.

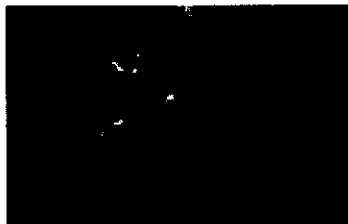
Các chồi nhỏ và mảnh lá của cây chuyển gen đã được xử lý với dung dịch X-Gluc, kết quả cho thấy chồi và mảnh lá này có màu xanh chàm đặc trưng khẳng định sự biểu hiện của gen *gusA* trong cây chuyển gen (H.19).

Các cây chuyển gen và đối chứng được phun thuốc trừ cỏ Basta (nồng độ 200 và 300 mg/l PPT) tại vườn ươm để kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *bar* trong cây chuyển gen. Sau 2 tuần nhận thấy các cây hồng chuyển gen tiếp tục sinh trưởng và phát triển bình thường, chỉ có một dòng cây hơi bị vàng lá phía dưới nhưng vẫn sống và phát triển cho khẳng định đây là những cây hồng đã nhận được gen chuyển.

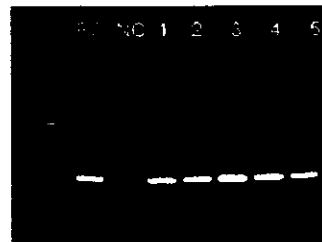
Sự hiện diện của gen *cryIA(c)* được kiểm tra qua phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt thu được bằng 0,65Kb, khẳng định đó là cây chuyển gen (H.20).



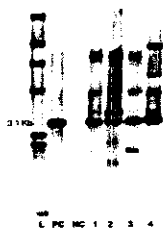
Hình 18. Biểu hiện GUS trong cây chuyển gen



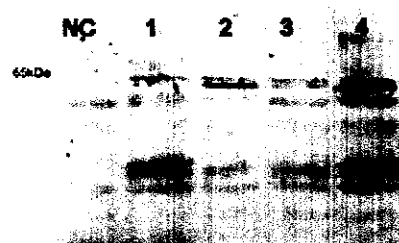
Hình 19. Cây Hồng chuyển gen phát triển, cây đối chứng chết trong môi trường chọn lọc PPT



Hình 20. Kết quả PCR của gen *cryIA(c)*: PC: Đối chứng dương; NC: Đối chứng âm, 1-5: các mẫu cây chuyển gen



Hình 21. Kết quả phân tích Southern blot của cây Hồng



Hình 22. Kết quả Western blot của cây Hồng



Hình 23. Cây Paulownia chuyển gen trồng để thử sâu

Các cây chuyển gen được kiểm tra khả năng kháng sâu *Heliothis armigera* cho kết quả: lá cây chuyển gen diện tích lá bị sâu ăn nhỏ, sâu tăng trưởng rất kém và sau 3 ngày sâu hoàn toàn không còn ăn và chết nhiều vào ngày thứ 5 hoặc 6.

Tiến hành kỹ thuật Southern blot với đoạn ADN 3,1 Kb gồm promoter, gen *cryIA(c)* và đoạn kết thúc được sử dụng làm đối chứng dương tính. Kết quả phân tích Southern blot (H.21) với các vạch (band) đã khẳng định sự hiện diện và đồng nhất gen *cryIA(c)* trong cây hồng chuyển gen.

Sản phẩm protein CryIA(c) trong các cây hồng chuyển gen được kiểm tra bằng phản ứng miễn dịch dùng kháng thể kháng gen *cryIA(c)*. Trên màng nitrocellulose xuất hiện vạch đối với tất cả cây chuyển gen, trong khi đó tại vị trí này (khoảng 5 kDa) không có phản ứng tương tác giữa kháng thể với protein của cây đối chứng (H.22). Chứng tỏ gen *cryIA(c)* hoạt động tốt, tạo ra được độc tố Bt trong cây chuyển gen, phù hợp với kết quả thử sâu trên cây hồng chuyển gen tại vườn ươm (H.23).

Có thể kết luận rằng bằng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105/pITB đã tạo ra một số dòng cây hồng mang gen *cryIA(c)* kháng sâu xanh *Heliothis armigera* và kết quả này đã được khẳng định bằng các kỹ thuật sinh học và sinh học phân tử.

3.4. Chuyển gen *anti-ACO* giữ hoa lâu tàn và gen *cryIA(c)* kháng sâu vào cây hoa cúc

Bên cạnh một số cây lương thực và cây rau được biến đổi gen, việc nghiên cứu chuyển gen vào đối tượng cây hoa nhằm kéo dài tuổi thọ của hoa cắt cũng được quan tâm. Trên thực tế, công nghệ gen ACO được ứng dụng để kéo dài thời gian tồn tại của hoa, lá, quả trên cây, ngăn cản sự già hóa,... Tất cả những cơ thể chuyển gen mang gen antisense ACC oxidase hoặc ACC synthase đều được xác định là có sự giảm đáng kể quá trình sinh tổng hợp ethylene. Nội dung nghiên cứu này nhằm chuyển gen *anti ACO* vào giống hoa cúc vàng nhằm kéo dài tuổi thọ và chuyển gen Bt (*cryIA(c)*) nhằm tăng tính kháng sâu của cây hoa cúc vàng.

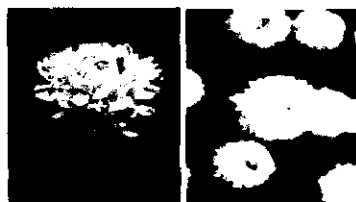
Các giống hoa cúc HCV1 và HCT1 (H.24) được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashie - Skoog, 1962) có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng và các thành phần cần thiết khác. Các plasmid dùng cho biến nạp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* bao gồm: Plasmid pAnti - ACO 2300 và plasmid pART 27 mang gen Bt (*cryIAc*) kháng sâu.

Lá non *in vitro* được cắt nhỏ, đặt trên môi trường (B3: MS đặc bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 g/l NAA cho giống HCT1; R6: MS đặc bổ sung 2,0 mg/l BAP và 1,0 mg/l NAA cho giống HCV1) nuôi 2-3 ngày trong điều kiện nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 16h/ ngày đêm, dùng làm nguyên liệu cho biến nạp.

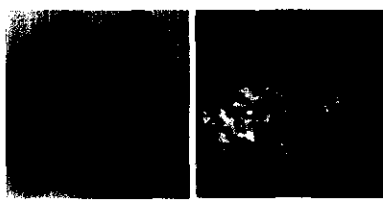
Vi khuẩn *Agrobacterium* được nuôi và lấy nhiễm vào mảnh lá, sau đó chọn lọc và tái sinh chồi (H. 25). Cây hoàn chỉnh được đưa ra cát với tỷ lệ sống là 95 - 99%. Sau khi bộ rễ đã hoàn thiện, cây được trồng ra đất với tỷ lệ sống là 95%.

Kháng sinh Kanamycin với nồng độ 50 mg/l được sử dụng làm yếu tố chọn lọc.

Quá trình chọn lọc được tiến hành đối với những cụm chồi 18 ngày tuổi. Kháng sinh Kanamycin ức chế quá trình sinh tổng hợp protein ở thực vật cho nên sau 14 ngày đã xuất hiện nhiều chồi có biểu hiện bạch tạng. Sau 35 ngày ở lò đối chứng, tỷ lệ bạch tạng thu được là 100%. Nhiều chồi biến nạp biểu hiện rõ tính kháng kháng sinh, chồi phát triển bình thường: thân lá xanh tốt (H.26). Tính kháng này có được là do tế bào có thể đã mang gen ngoại lai *npfl* được điều khiển bởi promoter CAMV35S. Khi promoter hoạt động, gen *npfl* sẽ mã hoá cho neomycin phosphotransferase (APH[3']-II) làm mất hoạt tính của kháng sinh nên cây vẫn phát triển được.



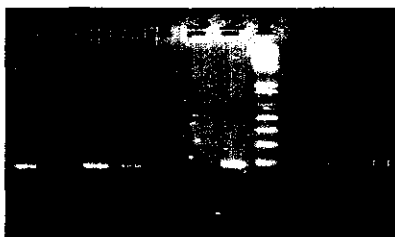
Hình 24. Giống cúc thí nghiệm: HCV1 và HCT1



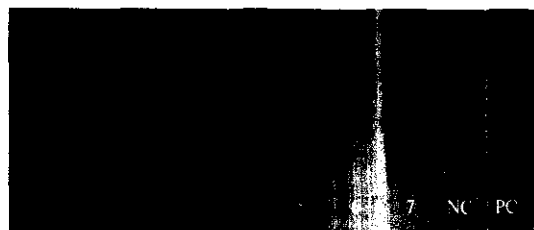
Hình 25. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá giống HCT1



Hình 26. Chọn lọc cây hoa cúc chuyển gen CryIAc Bên trái: Mẫu đối chứng; Bên phải: Mẫu chuyển gen



Hình 27. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mẫu HCV1
1: Maker 1kb; 2: Plasmid ART27; 3: H₂O; 4: Đối chứng, 5,6,8: Cây chuyển gen, 7: Cây không được chuyển gen



Hình 28. Kết quả lai ADN xác định gen *anti-ACO* trong cây hoa cúc chuyển gen, NC: negative control, PC: positive control, M: Marker; 1,2,7: Mẫu KT

Tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi 35S1/35S2 để nhân đoạn trình tự promoter 35S ở cây chuyển gen. Nếu mẫu ADN của cây nào cho phản ứng dương tính (có băng) thì chứng tỏ đoạn promoter 35S đã được chuyển thành công vào cây hoa cúc

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên gel agarose và so sánh với marker 1kb, chúng tôi xác định với giống HCV1 (H.27) nhận thấy các mẫu 5, 6, 8 là mẫu chuyển gen khi so sánh với marker và các mẫu đối chứng.

Sự có mặt của các gen trong cây một lần nữa được khẳng định nhờ kết quả lai Southern. Những mẫu ADN tách ra từ các cây trồng biến nạp được xử lý bằng enzyme giới hạn sau đó được chạy trên gel và được cố định lên màng lai nylon và được lai với các mẫu dò là các gen *anti-ACO* (Hình 28) thu được 3 dòng dương tính. Những dòng cúc chuyển gen đang được lưu giữ và tiếp tục nghiên cứu và đánh giá trong điều kiện nhà lưới về những tính trạng nghiên cứu.

Kết quả chung đã thu được 14 dòng cây hoa cúc mang gen *anti-ACO* và 20 dòng cây hoa cúc mang gen *Bt*.

3.5. Kết quả tạo dòng lúa kháng rầy và kháng sâu bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau

Công nghệ chuyển gen trên cây trồng hiện nay đang được thực hiện ở nhiều nước phát triển như Mỹ, Anh, Nhật, Pháp. Thành tựu của công nghệ chuyển gen trên cây lúa là chuyển được các gen hữu dụng vào cả hai nhóm lúa *indica* và *japonica*. Các gen này bao gồm gen kháng sâu, bệnh, kháng thuốc trừ cỏ, chịu mặn, hạn, gen làm tăng các vi dưỡng chất.

Hai phương pháp chuyển gen vào cây trồng thường được sử dụng là dùng súng bắn gen hoặc dùng vi khuẩn *A.tumefaciens* làm trung gian chuyển gen vào cây trồng. Các nghiên cứu nhằm hai mục tiêu chính:

1. Tiêu chuẩn hóa các phương pháp chuyển gen
2. Tạo dòng lúa biến đổi gen

3.5.1. Hoàn thiện quy trình chuyển gen trên lúa *indica* và tạo dòng kháng rầy nâu

Phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium* và máy bắn gen đã được thực hiện trên các giống lúa nhóm *indica* (IR64, KDML105) đang trồng phổ biến ở nước ta (ĐBSCL) và giống Taipei 309 thuộc nhóm *japonica* làm đối chứng.

Chuyển gen bằng *Agrobacterium*: Hạt gạo và phôi non (2 tuần sau trổ) của các giống KDML 105, IR 64 và Taipei 309 được dùng làm vật liệu nuôi cấy phôi non. Hoặc hạt gạo sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSC1. Sau 3 tuần, các mô sẹo có khả năng sinh phôi được tách nhỏ khoảng 1-2mm và chuyển sang môi trường tiền lây nhiễm MSC1 và giữ ở 28°C khoảng 4 - 5 ngày rồi chuyển sang môi trường MSGAs.

Mỗi phôi non và mô sẹo trên môi trường MSGAs được chủng với 10 µl dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens*, ủ 2-3 ngày trong tối ở 24-25°C. Sau 3 ngày, các phôi non và mô sẹo được chuyển sang môi trường MSRe có carbenicillin 250 mg/l và cefotaxim 100 mg/l để ức chế sự phát triển *A. tumefaciens*. Sau 3 tuần, các mô sẹo phát triển từ phôi non hay từ mô sẹo đã được chủng với vi khuẩn được tách nhỏ thành 1-2mm, cấy trên môi trường chọn lọc MSSe có carbenicillin 250 mg/l, cefotaxim 100 mg/l và hygromycin 30 mg/l trong 3 tuần. Các mô sẹo kháng hygromycin được tiếp tục chọn lọc trên môi trường có hygromycin 50 mg/l. Các dòng kháng hygromycin được chuyển sang môi trường tăng sinh N6P trong 2 hoặc 3 tuần trước khi chuyển sang môi trường tái sinh MSRe. Các dòng kháng này được giữ trong phòng nuôi cây có cường độ ánh sáng 2500 lux, độ ẩm 70%, nhiệt độ 28°C, 16 giờ chiếu sáng/ngày đêm. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Cây con sau đó được chuyển vào trồng trong nhà kính cho các phân tích tiếp theo.

Chuyển gen bằng súng bắn gen: Hạt gạo của các giống lúa KDML105, IR 64, Taipei 309 được khử trùng, cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSC1 và nuôi trong tối ở 28°C trong 3 tuần. Các mô sẹo có dạng sinh phôi được chọn và tách nhỏ (3mm) trên môi trường N60.5 trước khi bắn gen ít nhất 4 giờ. Dòng *E. coli* mang plasmid pWG1515-gusA-hpt mang gen hpt kháng hygromycin và gen *gus*, pUbi-*cryIA(c)*, pUbi-GNA được dùng cho ly trích plasmid-DNA. DNA được tẩm trên các hạt vi đạn bằng vàng (Au) có kích thước 1µm, các vi đạn mang DNA được bắn vào mô sẹo đã nuôi 4 giờ trên môi trường N6 nhờ máy bắn gen Biolistic PDS-1000 He với các khoảng cách và áp lực bắn khác nhau. Sau khi bắn 20-24 giờ, các mô sẹo được chuyển sang môi trường phục hồi MSC1 để nhân mô sẹo. Sau 2 tuần, các mô sẹo được tách nhỏ 1-2mm và chuyển sang môi trường chọn lọc MSSe có hygromycin 30 mg/l. Sau 3 tuần, các mô sẹo sống sót được tách nhỏ và chuyển sang môi trường chọn lọc lần thứ 2 có hygromycin 50 mg/l (H. 29). Các dòng kháng hygromycin và phát triển qua 2 lần chọn lọc được chuyển qua môi trường N6P (nhân nhanh mô sẹo) và theo dõi sự phát

triển của mô sẹo từ 2-3 tuần. Các mô sẹo phát triển tốt được chuyển sang môi trường tái sinh MSRe và nuôi ở 28°C trong tối 1 tuần trước khi được chuyển đến phòng sáng có ẩm độ 70%, nhiệt độ 28°C và thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày đêm. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Sau khi rễ đã phát triển đầy đủ, cây con được chuyển vào chậu đất và trồng ở nhà kính.

Trắc nghiệm sự biểu hiện gen *gus*: Trắc nghiệm sự biểu hiện tạm thời (transient assay) gen *gus* trong các tế bào (H. 31) được chuyển gen được thực hiện ở các mô sẹo vào ngày thứ 3 sau khi chủng hoặc bắn, trắc nghiệm sự biểu hiện ổn định (stable assay) ở các mô sẹo phát triển tốt qua chọn lọc trước khi tái sinh và ở cây tái sinh (Jefferson, 1987). Qua chọn lọc và tái sinh các dòng kháng phát triển, thu được 7 dòng Taipei 309, 5 dòng KDML 105 và 4 dòng IR 64.

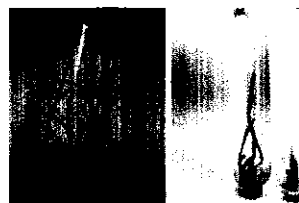
Trắc nghiệm sự biểu hiện của gen *gus* trên lá các dòng tái sinh cho thấy, số dòng cho phản ứng Gus dương tính ít hơn số dòng tái sinh có thể do các dòng thoát khỏi sự chọn lọc (escape) hoặc đoạn DNA được chuyển bị loại trừ khỏi tế bào trong quá trình phân chia, phân hóa.

Các vật liệu gồm mô sẹo được chủng *A. tumefaciens* hoặc bắn gen sau 3 ngày và đoạn phiến lá dài 5-10mm của các cây tái sinh được chuyển vào lỗ của đĩa nhiều giếng có chứa dung dịch X-Gluc. Quan sát sự biểu hiện gen *gus*, sau 24 giờ ủ ở các mẫu có những điểm màu xanh. Diệt lục tố trong lá được tẩy bằng hỗn hợp acetone: methanol (1:3).

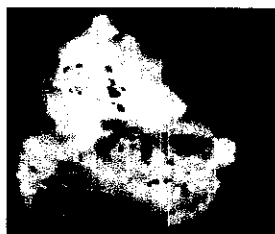
Chuyển gen bằng súng bắn gen: Máy bắn gen Biorad được sử dụng. Sau khi thử nghiệm các thông số bắn thích hợp, các giống lúa đang trồng phổ biến tại ĐBSCL được thử nghiệm khả năng tương thích với hệ thống chuyển gen. Qua chọn lọc và tái sinh các mô sẹo sống sót, thu được 5 dòng Taipei 309, 3 dòng KDML105, 2 dòng IR 64. Các dòng tái sinh này được thử nghiệm sự biểu hiện *gus* (H.30) và được chuyển sang trồng trên đất trong nhà lưới và phát triển bình thường (H.32).



Hình 29. Sự sống sót và phát triển của các mô sẹo trên môi trường chọn lọc (Hyg 50 mg/l) sau 2 tuần nuôi cấy.



Hình 30. Cây chuyển gen KDML105 tái sinh và sự biểu hiện gen *gus*



Hình 31. Kết quả thử nghiệm sự biểu hiện tạm thời gen *gus*



Hình 32. Sự sinh trưởng bình thường của cây chuyển gen



Hình 33. Thử nghiệm tính kháng rầy nâu của các dòng lúa chuyển gen *GNA*

Sau khi tiêu chuẩn hóa phương pháp chuyển gen, hai gen hữu dụng *GNA* (trên plasmid pUbi-*GNA*) và *cryIA(c)* được chuyển vào các giống lúa KDML105, IR64 và Taipei 309 (*japonica*) bằng súng bắn gen. Gen *GNA* được biết tạo tính kháng rầy nâu, gen *cryIA(c)* tạo tính kháng sâu đục thân.

Kết quả chuyển nạp gen *GNA* được ghi nhận như sau: ở áp lực 1100A, giống KDML105 cho tỷ lệ mô sẹo sống qua chọn lọc lần 2 đạt 8,3% so với giống Taipei 309 đạt 12,7%. Giống IR64 có tỷ lệ thấp hơn là 3,9%.

Thử nghiệm tính kháng rầy nâu của các dòng nhận gen *GNA*

Thử nghiệm sinh học tính kháng đối với rầy nâu: Chọn lọc theo phương pháp hộp mạ của IRRI. Giống được ngâm ủ nhũ mầm, cấy trong khay bùn mịn thành hàng, 5 lần nhắc lại kể cả TN1 và Ptb 33 (H. 33). Thả rầy đồng (cùng) tuổi 2 hoặc 3 khi cây mạ 2 hoặc 3 lá (2-4 ngày sau khi cấy) với mật số 4 đến 6 con/tép. Đánh giá khi giống chuẩn nhiễm cháy rụi ở cấp 9 (7 đến 10 ngày sau khi thả rầy), theo thang điểm cấp 9 của IRRI.

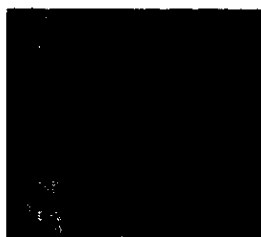
Các dòng biến đổi gen *GNA* thế hệ T4 được thử nghiệm tính kháng rầy nâu với giống chuẩn kháng Ptb33 mang gen kháng *Bph2* và *Bph3*, giống chuẩn nhiễm TN1 không mang gen kháng. Kết quả thấy trong các dòng lúa KDML105 chuyển gen *GNA*, một dòng T29 (14-1-2-5-2) có tính kháng cấp 3, so với giống chuẩn kháng cấp 1, chuẩn nhiễm cấp 9, giống bố mẹ gốc KDML105 cấp 9. Tỷ lệ dòng biến đổi gen cho phản ứng cấp 5 chiếm tỷ lệ 35,4% (17/48 dòng). Giống lúa có cấp kháng rầy nâu 3 - 5 trong thử nghiệm nhà lưới thường kháng rầy nâu trong điều kiện ngoài đồng. Các giống lúa đang trồng trong sản xuất hiện nay hầu như chưa có giống nào có tính kháng cấp 1. Các dòng lúa chuyển gen sinh trưởng bình thường trong nhà kính và biểu hiện sự kháng rầy nâu ở cấp 3 - 5.

3.5.2. Chuyển gen *Xa21*, *cryIA(b,c)* kháng sâu vào cây lúa thông qua *A. tumefaciens*

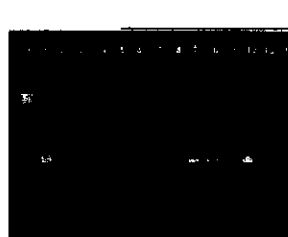
Trong nghiên cứu này, gen *Xa21*, *cryIA(b)* và *cry1A(c)* kháng sâu được chuyển vào lúa thông qua *Agrobacterium* và sử dụng hai hệ thống chọn lọc bằng mannose và chọn lọc bằng kháng sinh.



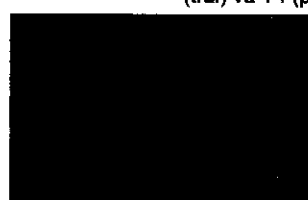
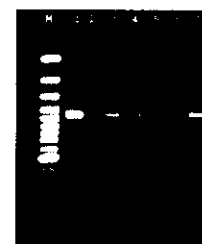
Hình 34. Mô sẹo đã nhiễm khuẩn sau 3 tuần chọn lọc



Hình 35. Cây tái sinh sau 50 ngày, đã tạo rễ.



Hình 36. Kết quả nhân đoạn gen *CryIA(c)* ở T1 (trái) và T4 (phải) bằng kỹ thuật PCR



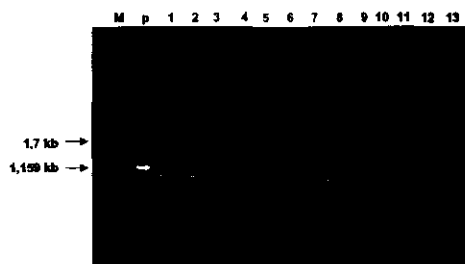
Hình 37. Một số hình ảnh về sàng lọc và đánh giá cây lúa chuyển gen *cryIA(c)* Trái: Thử sâu bằng thân cây lúa C71 (đối chứng âm); Phải: Thử sâu bằng thân cây lúa C71 chuyển gen *CryIA(c)* ở thế hệ T3 (đối chứng dương)



Hình 38. Dòng C67T4-11 kháng SDT; Đối chứng C71 không chuyển

Chọn lọc bằng hyg: Mô sẹo lúa 15-18 ngày tuổi, được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có mật độ $OD_{660}=0.2-0.4$ ($1.0 OD_{660}=3.10^9$ tế bào) trong 15 phút. Sau khi thấm khô dịch môi trường trên giấy lọc khử trùng, mô sẹo được nuôi cộng sinh (môi trường tạo mô sẹo có bổ sung $50 \mu M$ AS) với vi khuẩn trong 3 ngày ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, trong tối, rửa vi khuẩn trong môi trường lỏng có $300 mg/l$ cefotaxime, được cấy lên môi

trường chọn lọc có chứa 50 mg/l hygromycin và 250 mg/l cefotaxime trong 3-4 tuần. Những mô sẹo sống sót được cấy chuyển lên môi trường tái sinh, đặt dưới giàn đèn 2000 lux, 16 giờ / ngày đêm, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 3 - 4 tuần chọn lọc trên môi trường có hygromycin, các mô sẹo đối chứng chuyển sang màu nâu đen rõ rệt so với các mô sẹo nhiễm khuẩn (H.34). Hầu hết các mô đối chứng đều chết sau 4 tuần chọn lọc.



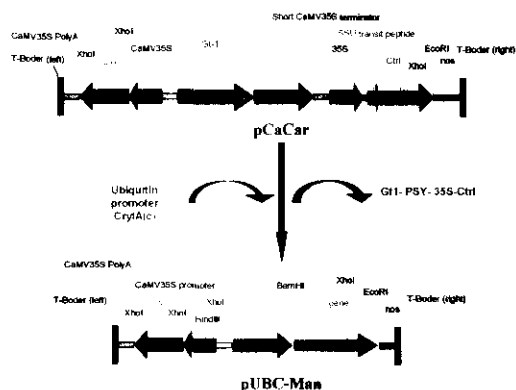
Hình 39. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra cây chuyển gen
M: marker PstI;
p: plasmid mang gen Xa21 (1,4 kb); 1: cây C71 không chuyển gen; 2 ... 13: cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen Xa21



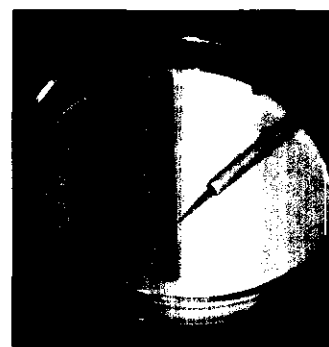
Hình 40. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* mọc trên môi trường phân lập

Sau khi lây nhiễm bệnh bạc lá cho 41 dòng cây C71 tái sinh từ mô sẹo sau biến nạp gen Xa21 (kháng hygromycine) và cây C71 không chuyển gen (đối chứng). Đánh giá khả năng kháng bệnh của các dòng lúa sau 7 ngày và 14 ngày lây nhiễm bệnh. Kết quả của thí nghiệm lây nhiễm bệnh bạc lá đã chỉ ra: trong số 41 dòng cây tái sinh từ các mô sẹo sau biến nạp gen Xa21, đã không có dòng cây nào có mức điểm thể hiện tình trạng nhiễm bệnh là thấp hơn so với cây đối chứng không chuyển gen (đạt từ 1 đến 3 điểm). Tuy nhiên, có 13/41 dòng (các dòng 5, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 36 và 41) là có % lá bị bệnh thấp hơn so với cây C71 không chuyển gen. Để khẳng định sự có mặt hay không của gen Xa21 trong 13 dòng cây này, cần phải tiến hành phân tích bằng PCR.

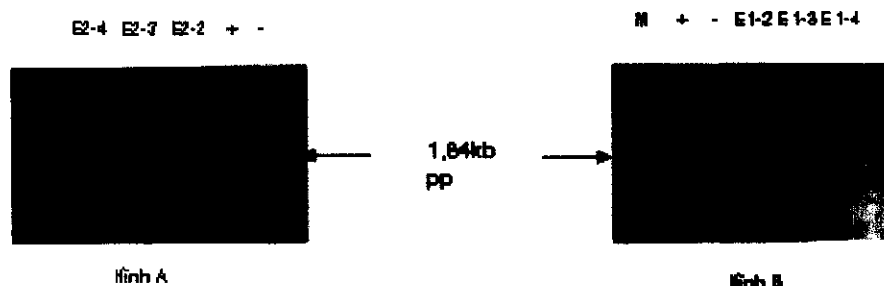
Tuy nhiên kết quả phân tích PCR âm tính của 13 dòng cây tái sinh từ các mô sẹo sau biến nạp gen Xa21 bằng kỹ thuật PCR cũng phù hợp với kết quả thử hoạt tính kháng bệnh nhân tạo là không có dòng cây (tái sinh từ mô sẹo chuyển gen) nào có mức điểm thể hiện sự kháng bệnh bạc lá (1 điểm và 3 điểm). Điều đó một lần nữa chứng tỏ rằng chưa có dòng cây nào đã được chuyển gen Xa21.



Hình 41. Sơ đồ vector pUBC-Man



Hình 42. Thử tính kháng sâu theo phương pháp đĩa

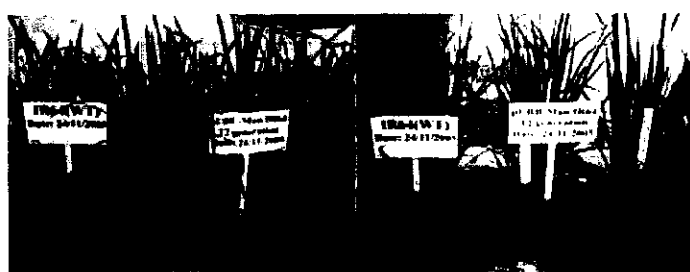


Hình 43. Phân tích Southern blot các dòng T0/ IR64 chuyển gen với plasmid

A. Phân tích Southern blot các dòng T0/ IR64 chuyển gen với plasmid pUBC-Man bằng *Agrobacterium*. DNA được cắt đoạn bằng *Bam*H I cộng *Eco*R I. Màng được lai với đoạn gen *cry1Ac* phương pháp đánh dấu DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 1.84kb của gen *cry1Ac*.
 (-) : Đối chứng không biến đổi gen. (+): Plasmid DNA.
 B. Phân tích Southern blot các dòng lúa T0/IR64 chuyển gen bởi plasmid pUBB-Man bằng *Agrobacterium*. DNA được cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*H I và *Eco*R I. Màng được lai với đoạn gen *cry1Ab* phương pháp đánh dấu DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 1.84kb của gen *cry1Ab*. (+): Plasmid DNA; (-) : Đối chứng không chuyển gen



Hình 44. Phân tích Southern của các dòng lúa Một bụi (T0) chuyển gen với pUBC-Man: S: cắt đơn bởi *Kpn*I, D: cắt đôi bởi *Xho*I. -: đối chứng 1. +: Plasmid DNA



Hình 45. Các dòng lúa chuyển gen trồng ở nhà kính để thử tính kháng

Do khả năng tái sinh của lúa *indica* đã được Fauquet và CS chứng minh là thấp hơn so với lúa *japonica* nên để rút ngắn thời gian đồng thời tăng khả năng tái sinh của cây lúa chuyển gen, các mô sẹo sống sót sau khi chọn lọc 3 - 4 tuần được chuyển lên môi trường R thay vì chọn lọc từ 6 - 8 tuần ở lúa *japonica*. Các mô sống sót này cho cây tái sinh sau khoảng 50 - 60 ngày (H.35). Các cây được tách riêng từ cụm cây tái sinh và sau đó cấy chuyển lên môi trường R chọn lọc có hygromycin nồng độ 50mg/l, chọn lọc từ 10 - 12 ngày, đối chứng là cây lúa C71 không chuyển gen và cây lúa C71 chuyển gen đã kiểm tra 45 dòng cây thu được 4 dòng cây dương tính thể hiện ở các cột 6, 7, 9, 10, 12 trên (H.36) đạt 6,6%. Tỷ lệ cây chuyển gen này cao hơn so với các kết quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào lúa *indica* đã đạt được trước đây. Hạt thế hệ T₁ của các dòng cây dương tính này được kiểm tra bằng PCR và đã thu được một dòng cây T₂ dương tính.

Hạt thế hệ T₁, T₂, T₃, T₄ của các dòng cây PCR dương tính được sử dụng để đánh giá thử bằng sâu đục thân thu được 5 dòng cây kháng sâu: 1) C66T1-11; 2) 1.4/T1-3; 3) C66T2-25; 4) C66T2-18; 5) C66T2-27. Thế hệ T₄ thu được 5 dòng cây phản ứng PCR dương tính: 1) C66T4-3; 2) C66T4-11; 3) C66T4-25; 4) C66T4-27; 5) C66T4-17 và trong đó có dòng C66T4-11 cho kết quả thử sâu là 100% kháng sâu đục thân sau 3 lần nhắc lại (H.38). Những cây có phản ứng PCR dương tính đang được tiến hành lai Southern và Western (H.38).

Chọn lọc bằng mannose: Vector pUBC-Man được thiết kế bằng cách dùng vector pCaCar, nhưng gen *crtI* và *psy* trên được thay bằng ubiquitin promoter-*cry1Ab* (H.41).

Phôi non của giống lúa IR64 và phôi già từ hạt gạo KDML105, Một Bụi được nuôi cấy tạo mô sẹo, chủng với *A. tumefaciens* chứa vector trên. Chọn lọc được tiến hành cách nhau trên môi trường MS có chứa 30 g/l sucrose và 25 g/l mannose (D(+)-mannose 99+%, Heros Organics, Geel, Belgium) ở vòng chọn lọc thứ nhất, 15 g/l sucrose và 25 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ hai và 5 g/l sucrose cộng với 35 g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba. Các cây kháng mannose được kiểm tra lại bằng xét nghiệm chlorophenol red trước khi chuyển trồng ra đất.

Hiệu quả biến đổi gen đối với vectơ pUBB-Man trên giống IR64 từ 1,00 - 2,40% và KDML105 từ 0,79 - 3,33%, Một Bụi 5,50 - 5,80% đối với vectơ pUBC-Man trên giống IR 64 từ 1,80 - 4,78% và KDML105 từ 1,81 - 3,07% và Một Bụi 4,16 - 5,71%. Aldermita và Hodges (1996) thực hiện chuyển gen trên giống IR64 bằng *Agrobacterium* và chọn lọc bằng hygromycin, thu nhận hiệu quả biến đổi thấp hơn hiệu quả đạt được ở nghiên cứu này. Chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens* và chọn lọc bằng đường mannose đối với các giống lúa *indica* cho hiệu quả chuyển gen cao. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, nồng độ 5g/l sucrose cộng với 35g/l mannose đã được sử dụng ở vòng chọn lọc thứ ba. Hoa và CS (2003) báo cáo đã dùng 5g/l sucrose cộng với 50g/l mannose ở lần chọn lọc thứ ba cho giống Taipei 309. Nồng độ mannose cần cho chọn lọc đối với giống *indica* thấp hơn *japonica*.

DNA được trích từ lá cây chuyển gen, cắt đoạn với *EcoRI* và *BamHI* để xác định sự hiện diện của gen *cry1Ab* đối với dòng lúa chuyển gen bằng pUBB-Man và cắt đoạn với *KpnI* (một điểm cắt) để xác định số copy (Hình 43b). Tương tự DNA của các dòng lúa chuyển gen bằng pUBC-Man được cắt đoạn với *EcoRI* và *BamHI* hoặc *XhoI* để xác định sự hiện diện của gen *cry1Ac* và cắt với *KpnI* để xác định số copy (Hình 43a). DNA cắt đoạn được chạy điện di qua gel agarose 0.8% trước khi chuyển bằng mao dẫn và cố định trên màng nylon (Hybond-N+, Amersham). Gen *cry1Ab* và *cry1Ac*, được đánh dấu bằng DIG (Boehringer, Rotkreuz, Switzerl), được dùng làm mẫu dò lai (probe). Lai, rửa, phát hiện và xác định gen được thực hiện theo phương pháp của Wiinn và CS. (1996).

3.5.3. Phân tích sự phân ly của các dòng lúa biến đổi gen

Hạt tự thụ T_1 từ các cây lúa biến đổi gen T_0 được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS + 20g/l mannose. Các cây kháng phát triển trên môi trường sau 2 tuần được chuyển trồng trên đất trong nhà lưới. Mẫu lá được lấy để phân tích Southern (H.44).

Thử tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scirpophaga incertulas* của các dòng lúa biến đổi gen Bt. Các dòng lúa thử nghiệm được trồng trong chậu nhựa nhỏ đường kính 15cm, 3 chậu/dòng, cấy ở tuổi mạ 15 ngày và thử nghiệm ở giai đoạn 30 ngày sau khi cấy (H.45). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại trong 3 khay tôn kích thước 1.2 x 2.4 x 0.2 m theo (1) Phương pháp thử nghiệm đĩa petri (H.4) và (2) Phương pháp thử nghiệm toàn cây.

Đánh giá tính kháng của các dòng lúa thử nghiệm theo thang điểm 0 - 9 dựa trên tỷ lệ số chồi chết vào 20 ngày sau khi chủng sâu. Kết quả ghi nhận giống chuẩn kháng W1263 có cấp 5 (hơi nhiễm), giống chuẩn nhiễm IR29 có cấp 7 (nhiễm). Trong 30 dòng biến đổi gen T_1 , sự phân bố tính kháng như sau:

Cấp 0 (kháng cao):	không có dòng nào.
Cấp 1 (kháng):	13 dòng chiếm 43,3 %
Cấp 3 (kháng vừa):	10 dòng chiếm 33,3 %
Cấp 5 (nhiễm nhẹ):	3 dòng chiếm tỷ lệ 10,0 %
Cấp 7 (nhiễm):	4 dòng chiếm tỷ lệ 13,3 %

Với các dòng biến đổi gen thế hệ T_1 và T_2 , một số kết luận có thể rút ra như sau:

Gen kháng sâu đục thân *cry1A(c)* hoạt động hữu hiệu ở lúa, tạo tính kháng sâu cao, trong khi giống chuẩn kháng W1263 cho phản ứng nhiễm trong thử nghiệm sinh học. Số dòng biến đổi gen thế hệ T_1 kháng cấp 1 chiếm tỷ lệ đến 43,3%. Số dòng biến đổi gen thế hệ T_2 cho 100% số sâu chết chiếm tỷ lệ đến 73% (27/37 dòng). Kết quả này cho thấy, sự biểu hiện gen Bt (*cry1A(c)*) rất hiệu quả trong tạo ra tính kháng sâu đục thân ở lúa, số dòng biến đổi gen cho tính kháng cao (cấp 1) chiếm tỷ lệ đến 43,3%.

Để phân tích sự phân ly của các dòng biến đổi gen, hạt tự thụ của các cây biến đổi gen (thế hệ T_1)

được cấy trong môi trường 1/2 MS có 20g/l mannose. Cây kháng được đánh giá sau 2 tuần nuôi cấy và được chuyển vào trồng nhà lưới để lấy mẫu phân tích Southern. Sự phân ly các dòng T_1 trên môi trường chọn lọc có chứa mannose theo tỷ lệ 3 kháng: 1 nhiễm theo định luật Mendel trong trường hợp gen được chuyển gắn vào nhiễm sắc thể một cách đơn giản.

Số dòng biến đổi gen kháng tăng qua mỗi thế hệ và có thể sớm chọn được dòng kháng đồng hợp tử.

3.6. Các phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen

3.6.1. Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở mức phòng thí nghiệm

3.6.1.1. Phương pháp sinh lý thử tính kháng kháng sinh

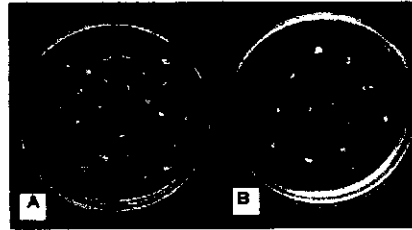
a) Hạt nảy mầm trên KS

Hạt bông được bóc vỏ và đặt trên môi trường MS (Vitamin B5, pH 5,8) có bổ sung Km ở các nồng độ khác nhau 0; 100 mg/l; 200mg/l; 400mg/l; 600mg/l; 800mg/l và 1000mg/l.

Kết quả H.46 chỉ ra rằng ở nồng độ 100mg/l Km thì tất cả các cây đối chứng hạt nảy mầm có lá mầm chuyển sang màu vàng, cây không có rễ. Trong khi đó với các cây bông đã chuyển gen kháng sâu thì hạt vẫn nảy mầm bình thường có lá mầm màu xanh, cây có rễ. Ngưỡng nồng độ nồng độ Km cao nhất cây bông có khả năng chống chịu được để sống sót và sinh trưởng bình thường là 500mg/l, nồng độ thích hợp để sàng lọc các dòng cây bông chuyển gen sau khi tiêm bông và thu hoạch quả.



Hình 46. Cây bông chuyển gen và cây bông đối chứng nảy mầm trên môi trường chọn lọc



Hình 47. Mảnh lá của cây bông chuyển gen (A) và cây bông đối chứng (B) trên môi trường chọn lọc

b) Cấy mô trên môi trường chứa KS

Các lá bánh tẻ của cây bông nuôi cấy invitro được cắt thành những mảnh nhỏ với kích thước 5x5mm và đặt chúng lên môi trường MS có bổ sung Km với các nồng độ khác nhau (0, 100, 200, 300mg/l). Và đánh giá tỷ lệ sống của các mảnh lá cây sau 5 tuần các mảnh lá bông của cây đối chứng chuyển sang màu vàng và màu nâu, tỷ lệ các mảnh lá màu xanh là rất thấp và thấp nhất ở giống LRA là 0% ngay ở nồng độ 100mg/l. Đối với các giống bông chuyển gen kháng sâu như CS 95; 96 có tỷ lệ mảnh lá màu xanh cao hơn và đạt cao nhất là 44,8%. (H.47)

3.6.1.2. Phương pháp sinh hóa

a) Phân tích sự biểu hiện của gen npII ở các dòng bông chuyển gen bằng phương pháp Elisa

Kết quả H. 48 cho thấy các dòng bông lai giữa dòng chuyển gen kháng sâu và dòng không chuyển gen (thế hệ F_1 , F_2) vẫn cho kết quả Elisa dương tính. Kết quả này cũng rất phù hợp với kết quả đánh giá tính kháng sâu và phân tích phân tử các dòng này.



Hình 48. Phân tích ELISA các dòng bông chuyển gen
Hàng trên: A1: protein NptII 3ng/ml, A2: 0,75ng/ml, A3,A4: blank, A5: Vn-36P, A6: LRA, A7: VN-15, A8: VN-15 (pha loãng 2 lần)
Hàng dưới: B1: C118a, B2: VN-16, B3: VN-016, B4: CS95, B5: SB1, B6: VN-015, B7: CRI29, B8 CRI29 (pha loãng 2 lần). Các giống CS95, CRI29(Fo), VN-15, VN-16 (F1), và VN-015, VN-016 (F2) cho kết quả dương tính



Hình 49. Sự thể hiện của gen *gus* của rễ cây lúa chuyển nạp gen kháng sâu trong dung dịch X-gluc

b) Xác định gen *gus* bằng phương pháp thử với cơ chất sinh màu

β -Gluconidase (*gus*) dễ bị thủy phân trong dung dịch X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Gluconidase) không màu sẽ tạo ra màu xanh đặc trưng. Rễ cây lúa chuyển gen kháng sâu được cắt nhỏ thành từng đoạn và ngâm vào dung dịch X-gluc trong 24h ở nhiệt độ 37°C để quan sát sự thay đổi màu sắc của rễ. (H. 49)

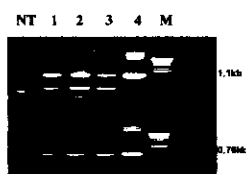
3.6.1.3. Phương pháp sinh học phân tử

a) PCR

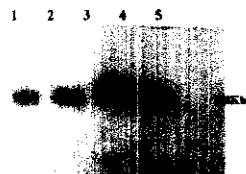
Phương pháp: 10ng ADN mẫu, 5ng cho một primer, 0,16mM dNTPs, 1 đơn vị PCR Buffer (10mM Tris, pH=8.4, 50mM KCl và 15mM MgCl₂), 1 đơn vị Taq polymerase. Chương trình PCR được thiết kế với bước 1 ở 94°C trong 5 phút (35 vòng); bước 2: 94°C 30 giây; bước 3: 55°C 30 giây; bước 4: 72°C trong 1 phút. (H.50)

b) Phép lai Southern (Southern blotting)

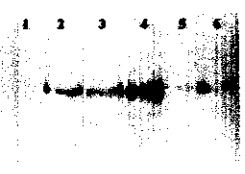
DNA tổng số được chiết xuất từ lá non của cây lúa chuyển nạp gen (T₀, T₁) và của cây chưa chuyển nạp gen theo (Dellaporta và CS, 1983). Hai enzyme giới hạn là *EcoRV* và *BamHI* đã được sử dụng để cắt DNA của cây chuyển gene. Sau khi điện di trên gel agarose 0,8%, DNA được chuyển lên màng Hybond-N⁺ (Amersham) và được lai với mẫu dò (đoạn DNA 660 bp có chứa phân tử phóng xạ [³²P] dCTP). Kết quả hiện phim của lai DNA (H.53) cho thấy: ở tất cả các cây chuyển gen đều thể hiện sự có mặt của gen ngoại lai thông qua sự thể hiện vị trí vạch tương ứng của *BamHI* (tương ứng 1,8kb) và của *EcoRV* (9,4kb), trong khi đó ở băng đối chứng hoàn toàn không có các vạch đặc trưng này.



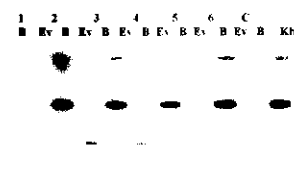
Hình 50. Sự thể hiện của gen *gus* (1,1kb) và gen *hph* (0,76kb) ở cây đã chuyển gen (1-4) so với đối chứng (NT) và so với vạch chuẩn (M)



Hình 51. Kết quả lai ARN (Northern blotting)
1-4 : Cây chuyển nạp gen ;
5: Đối chứng (cây chưa chuyển nạp)



Hình 52. Kết quả phản ứng Western blot



Hình 53. Kết quả lai ADN (Southern blotting)
1-6: cây chuyển nạp gen . B: *BamHI*; Ev: *EcoRV*; C : Đối chứng

c) Phép lai Northern (Northern blotting)

Khả năng hoạt động của gen trong tế bào cây chủ được đánh giá thông qua ARN tổng số theo quy trình của Sambrook và CS (1989). Kết quả sản phẩm phiên mã trong quá trình biểu hiện gen *cryIA(c)* ở trong cây chuyển nạp gen là mARN được đánh giá qua kết quả phân tích mRNA (Northern Blott) (H. 51) cho thấy: Sản phẩm phiên mã của 4 cây chuyển nạp gen đều thể hiện ở mức cao tương ứng với kích thước

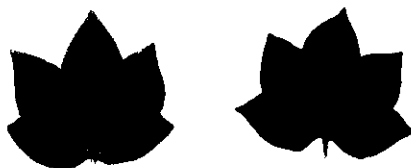
phân tử là 1,8kb, còn ở cây đối chứng thì không thấy có sự biểu hiện nào.

d) Phép lai Western (Western blotting)

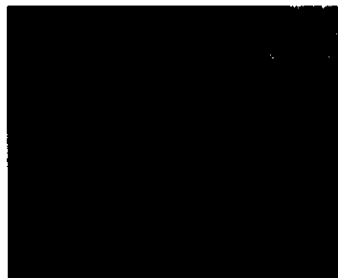
Protein tổng số được chiết xuất từ mô lá của cây chuyển nạp gen và cây chưa chuyển nạp gen được dùng để đánh giá sản phẩm protein của cây chuyển nạp gen. Protein sau khi điện di trên gel SDS-acrylamide được chuyển lên màng nitrocellulose. Sau đó màng này được cố định bởi sữa TBST 24 giờ rồi lai với mẫu dò (kháng thể thô 1 ngày).

3.6.2. Thử cây chuyển gen trong nhà kính

3.6.2.1. Tạo vết cháy kháng sinh trên lá



Hình 54. Thử tính kháng Km của 2 giống bông kháng sâu (phải) và giống bông đối chứng không kháng sâu. Nồng độ Km lần lượt từ trái sang là 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5g/L



Hình 55. Kết quả phép thử sinh học đối với cây chuyển gen *cryIAc*. T: Sâu non ăn lá cây chuyển nạp gen; U: Sâu ăn lá cây chưa chuyển nạp gen

3.6.2.2. Thử tính kháng sâu

Tính độc của cây lúa đã được chuyển gen kháng sâu đục thân lúa được tiến hành bằng hai cách và kết quả nhận được là sâu non của sâu đục thân hai chấm bắt đầu chết sau hai ngày ăn thân của cây chuyển nạp gen *cryIA(c)*, còn sâu non ăn thân của cây không chuyển nạp thì vẫn sống và phát triển bình thường. Tỷ lệ sâu non bị chết là 73%. Khi ăn trực tiếp mô lá của cây đã chuyển gen thì sâu non chết hoặc thể hiện màu nâu điển hình trước khi chết (H.55)

3.6.2.3 Thử tính chịu hạn/mặn

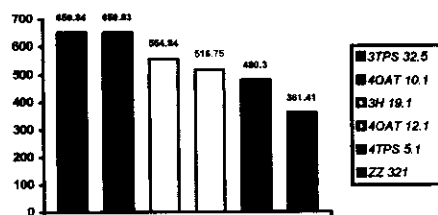
Hạt của các dòng lúa Zhongzua chuyển gen *tps*, *oat*, *hal* bao gồm: Hai dòng lúa chuyển gen *tps* điều khiển sinh tổng hợp trehalose (3TPS 32.5, 4TPS 5.1); một dòng lúa chuyển gen *hal* chưa rõ cơ chế nhưng có khả năng chịu muối ở cà chua, dưa hấu, lúa mạch; hai dòng lúa chuyển gen *oat* (4 *oat* 10.1, 4 *oat* 12.1) điều khiển quá trình vận chuyển orthinine đã kiểm tra sự có mặt của các gen chuyển bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, lai southern ở thế hệ T_2 , và đối chứng là giống lúa Zhongzua 321 không chuyển gen do dự án INCO, Brussel, Bỉ cung cấp.

i) Đánh giá tính chịu hạn

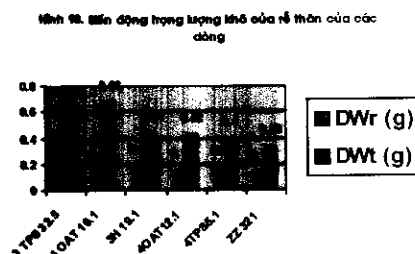
Kết quả thí nghiệm cho thấy các dòng 4OAT 10.1; 3TPS 32.5; 4OAT 12.1; 4TPS 5.1 trong khi xử lý hạn vẫn dễ nhánh, số nhánh dao động 0,2-1,3 nhánh/10 cây trong khi các cây không chuyển gen Zhongzua 321 (đối chứng) không dễ nhánh. Điều này chứng minh rằng trong điều kiện hạn, các dòng cây được chuyển gen chịu hạn có khả năng phát triển tốt hơn so với cây không chuyển gen.

Trọng lượng tươi và khô của rễ và thân của các dòng nghiên cứu cũng được xác định nhằm đánh giá sự biểu hiện của cây lúa chịu hạn. Kết quả cho thấy: tất cả các dòng cây chuyển gen đều có trọng lượng tươi, khô của rễ và thân cao hơn so với cây đối chứng không chuyển gen, trong đó, dòng 4OAT có trọng lượng tươi, khô trung bình của rễ và thân cao nhất. Trọng lượng khô của rễ đạt 0,26g tăng 85,7%, trọng lượng khô của thân đạt 0,68g tăng 106,1% so với cây đối chứng. Đặc biệt hai dòng 4OAT 10.1 và 3TPS 32.5 có trọng lượng khô của rễ và thân tăng cao nhất. Mức độ biến động chiều dài rễ và thân của các dòng

cây thử nghiệm được thể hiện ở H.57.



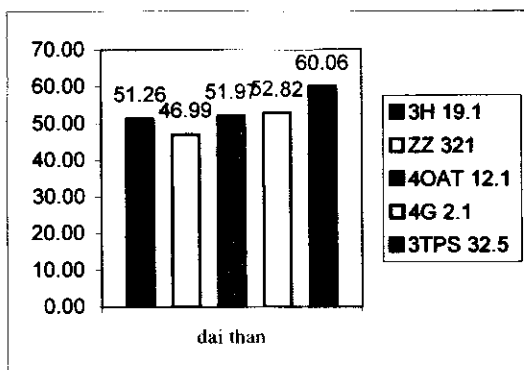
Hình 56. Chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng



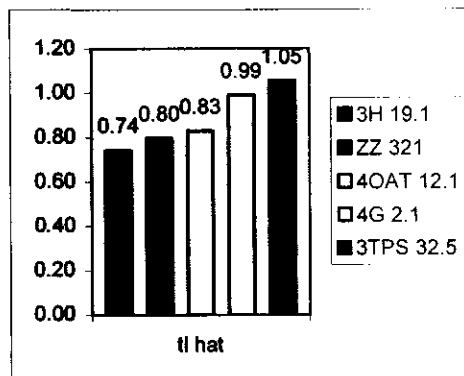
Hình 57. Biến động trọng lượng khô của rễ thân các dòng

ii) Đánh giá tính chịu mặn

Các dòng cây chuyển gen thử nghiệm trồng trong đất nhiễm mặn ở nồng độ 100mM, 150mM, 200mM NaCl không có biểu hiện hình thái gì khác lạ.



Hình 58. Biến động chiều dài thân ở các dòng



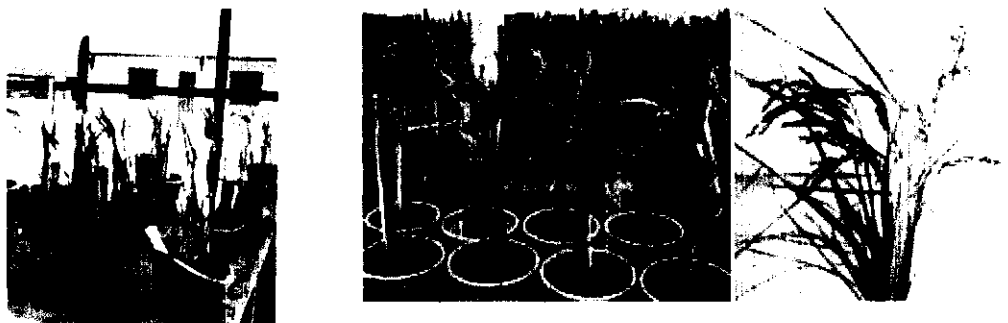
Hình 59. Biến động trọng lượng hạt ở các dòng

Số nhánh/bông ở các dòng chuyển gen và không chuyển gen ít dao động. Xét khả năng tích lũy chất khô, cả 3 dòng cây chuyển gen đều đạt chỉ số cao hơn cây không chuyển gen, dòng 3TPS 32.5 đạt chỉ số cao hơn hẳn so với dòng đối chứng (+). Đặc biệt phân tích chỉ tiêu trọng lượng hạt đây là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá năng suất cho thấy các dòng chuyển gen 3TPS 32.5, 4OAT 12.1 có chỉ số cao hơn, dòng 3TPS là dòng đạt chỉ số cao nhất hơn cả với đối chứng (+), riêng dòng 3H 19.1 có trọng lượng hạt đạt thấp hơn so với cây không chuyển gen. Mức độ biến động trọng lượng hạt của các dòng cây chuyển gen sau khi xử lý mặn được thể hiện ở H.59.

Từ các kết quả và phân tích ở trên chúng tôi đi đến kết luận: Hai dòng lúa chuyển gen 3TPS 32.5 và 4OAT 12.1 có khả năng chịu mặn cao hơn so với dòng ZZ 321 không chuyển gen. Trong điều kiện nhiễm mặn ở nồng độ 200mM NaCl các cây lúa chuyển gen này cho biểu hiện sinh trưởng phát triển bình thường, không xuất hiện đặc tính khác lạ. Các chỉ tiêu về chiều cao cây, số nhánh/bông, trọng lượng hạt, tích lũy chất khô đạt cao hơn so với cây không chuyển gen. Đặc biệt dòng 3TPS 32.5 có các chỉ tiêu phân tích đạt cao nhất, cao hơn cả đối chứng (+), đây là dòng cây chuyển gen có triển vọng nhất.

3.6.3. Lai tạo để kiểm tra cây chuyển gen

Lai chéo giữa các dòng 3TPS 32.5, 3H 19.1, 4OAT12.1. Vào thời kỳ cây lúa chuyển gen ở giai đoạn làm đòng, khi 1/3 đòng nhú ra khỏi bẹ lá, tiến hành khử đực cho các cây dùng làm mẹ, thời gian khử đực từ 17h-20h30. Tiến hành lai vào ngày hôm sau (thời gian từ 11h-13h) khi hoa ở các cây dùng làm đòng mẹ nở.



Hình 60. Cây lúa lai

3.7. Cơ sở khoa học và qui trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng

3.7.1. Cơ sở khoa học việc đánh giá an toàn sinh học đối với GMO

Cơ sở đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng côn trùng đã được nhiều phòng thí nghiệm ở nhiều nước rất quan tâm nghiên cứu. Và chúng ta có thể vận dụng các kết quả nghiên cứu hay tham khảo các kết quả này vào điều kiện thực tế ở nước ta. Tuy nhiên, hiện nay ở nước ta vấn đề xây dựng khung pháp lý về ATSH nhằm đánh giá an toàn sinh học của các cây trồng chuyển gen nói riêng và các sinh vật biến đổi gen nói chung là rất cần thiết và cấp bách. Việc đánh giá, quản lý rủi ro cần được thực hiện để đảm bảo an toàn cho con người và môi trường sống. Nhìn chung, vấn đề này cũng đang còn rất nhiều các ý kiến tranh luận của các chuyên gia. Trong điều kiện nước ta và trong giới hạn đề tài KC04.13 chúng tôi xin đưa ra một số tổng quan về đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng tạo cơ sở lý thuyết cho các bước đánh giá ATSH cho cây trồng chuyển gen sau này.

3.7.1.1. Giới thiệu về gen kháng côn trùng

Giới thiệu về vi khuẩn Bacillus thuringiensis

Bt là trực khuẩn sinh bào tử, hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, gram (+). *Bt* có khả năng sản sinh protein tinh thể độc ở dạng ngoại bào (β , α , γ - exotoxin) và nội bào (δ - endotoxin). Trong các protein tinh thể độc, δ - endotoxin là một họ protein tinh thể độc chính gây độc hệ tiêu hoá của côn trùng. Trong các loại độc tố, thì δ -endotoxin, β -exotoxin là các độc tố được nghiên cứu nhiều nhất về mặt phân tử và phổ tác dụng với côn trùng, chúng tác dụng hầu hết lên các loại côn trùng thuộc Bộ Cánh vảy (Lepidoptera), Hai cánh (Diptera), Cánh cứng (Coleoptera) và Tuyến trùng (Nematoda).

Cơ chế tác động

Sau khi xâm nhập vào các ấu trùng của côn trùng đích qua đường tiêu hoá, protein *Bt* được hoạt hoá dưới tác động của môi trường kiềm trong ruột côn trùng, liên kết với các thụ thể và chọc thủng ruột giữa gây nên sự tổn thương làm chúng ngừng ăn. Kết quả là côn trùng chết sau một vài ngày.

3.7.1.2. Tổng quan về đánh giá an toàn sinh học của gen kháng côn trùng

Đánh giá an toàn sinh học là quá trình kiểm định một cách khoa học về các tác hại tiềm tàng của một GMO đối với sức khoẻ môi trường, con người và động vật. Đây cũng là nhân tố duy nhất để đánh giá xem một GMO hoặc một sản phẩm có được cấp phép cho sử dụng hoặc nghiên cứu.

a) Các định nghĩa

- **Sinh vật biến đổi gen** là các thực vật, động vật, vi sinh vật mang một tổ hợp mới vật chất di truyền (ADN) nhờ sử dụng công nghệ sinh học hiện đại.
- **Thực phẩm chuyển gen** là thực phẩm do các sinh vật đã được biến đổi gen và sản phẩm của chúng tạo ra.

- **An toàn sinh học** (Biosafety) là thuật ngữ chỉ các quy định của cộng đồng nhằm đánh giá và phòng ngừa các rủi ro (Risks) do việc đưa vào sản xuất và tiêu thụ các sinh vật được biến đổi di truyền (Genetically Modified Organisms-GMOs)

b) Đánh giá rủi ro đối với môi trường

Các vấn đề lo ngại chính về tác động của các sinh vật chuyển gen (GMOs) tự nhiên cũng như các loài khác. Hậu quả là gây nên sự thay đổi các mối quan hệ sinh thái hoặc các nhân tố vô sinh và hữu sinh ở hệ sinh thái có GMOs. Như vậy, nguồn gốc của những lo lắng trên là bắt nguồn từ mối hiểm họa về đa dạng sinh học của các nơi sản xuất GMOs.

Nước ngầm và hệ sinh thái đất

Protein *Bt* tồn tại tương đối bền trong đất và được phân loại như là dạng bất động vì chúng không có khả năng di chuyển hoặc thấm qua nước ngầm. Các protein không bền vững trong điều kiện đất axit. Khi phơi dưới ánh nắng mặt trời, chúng bị phân hủy nhanh chóng dưới tác động của tia UV.

Các chuyên gia đã tiến hành những nghiên cứu độc lập nhằm điều tra các ảnh hưởng của cây trồng *Bt* đối với sinh vật đất và các loài côn trùng khác được xem là có ích trong nông nghiệp. Kết quả cho thấy, chúng không gây ra ảnh hưởng bất lợi nào đối với các sinh vật đất không phải là đích tấn công của chúng, thậm chí ngay cả khi các sinh vật này được xử lý *Bt* với liều lượng cao hơn nhiều so với thực tế có thể xảy ra trong điều kiện trồng trọt tự nhiên.

Động vật và côn trùng

Các thử nghiệm tiến hành trên chó, chuột lang, thỏ, cá, ếch, kỳ giông và chim cho thấy protein *Bt* không gây ra những ảnh hưởng có hại. Cũng cần nhấn mạnh rằng, độc tố cũng hoàn toàn không gây ảnh hưởng đến các loài côn trùng có ích hoặc động vật ăn thịt như ong mật và bọ cánh cứng (Extoxnet, 1996).

Năm 1999, có một báo cáo về ảnh hưởng có hại của hạt phấn từ cây ngô *Bt* đến ấu trùng của loài bướm Monarch. Báo cáo này đã gây ra mối quan tâm và lo ngại về những rủi ro mà thực vật *Bt* có thể gây ra đối với sinh vật không cần diệt. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy ngô *Bt* gây ảnh hưởng không đáng kể đối với quần thể bướm Monarch trên cánh đồng.

Phát triển tính kháng của côn trùng

Một lo ngại khác về thực vật *Bt* là sự phát triển tính kháng của côn trùng đối với *Bt*. Chính phủ, Bộ ngành và các nhà khoa học đã đưa ra các kế hoạch quản lý tính kháng của côn trùng để giải quyết vấn đề này. Những kế hoạch này bao gồm một qui định rằng mọi cánh đồng trồng cây chuyển gen kháng côn trùng phải có cả cây không chuyển gen để côn trùng phát triển mà không bị chọn lọc đối với những giống kháng sâu. Những biện pháp quản lý tính kháng khác cũng đang được các nhà khoa học trên khắp thế giới xây dựng.

c) Đánh giá rủi ro đối với sức khỏe con người và an toàn lương thực

Mối lo ngại lớn nhất đối với thực phẩm GMOs là những protein mới tạo ra có thể gây độc hoặc gây dị ứng. Ngoài ra, còn các nguy cơ khác như giảm nồng độ một số chất dinh dưỡng trong khi lại tăng nồng độ một số chất khác.

Ảnh hưởng đến sức khỏe con người

Protein *Bt* có an toàn đối với các sinh vật không cần diệt? Tính đặc hiệu của độc tố *Bt* đối với côn trùng đích là một trong những tính trạng khiến *Bt* trở thành thuốc trừ sâu sinh học lý tưởng. Trên thực tế, các chủng *Bt* khác nhau sản sinh ra các protein độc đối với một số loài côn trùng nhất định. Độc tố của protein

Bt tương tác trực tiếp với thụ quan. Có nghĩa là đối với những côn trùng bị ảnh hưởng bởi protein Bt, trong ruột chúng phải có các vị trí thụ quan đặc trưng để protein có thể kết bám. May mắn là người và đại đa số các côn trùng có ích không có các thụ quan này.

Sự kháng kháng sinh

Mối quan tâm trong việc sử dụng gen chọn lọc này là việc dùng nó có thể dẫn đến khả năng kháng kháng sinh trong các quần thể vi khuẩn. Ngày càng có nhiều lo lắng rằng các gen chỉ thị này có thể được truyền từ các cây trồng chuyển gen sang các vi sinh vật cư trú trong ruột người và làm chúng tăng khả năng đề kháng đối với kháng sinh. Đến nay đã có rất nhiều các nghiên cứu và thử nghiệm khoa học về vấn đề này để đi tới các kết luận sau:

- Khả năng các gen kháng kháng sinh có thể được chuyển từ các cây trồng chuyển gen sang các sinh vật khác là vô cùng nhỏ;
- Thậm chí khi một gen kháng kháng sinh được chuyển sang một sinh vật khác thì tác động của việc này cũng không đáng kể do các loại kháng sinh được sử dụng trong GMCs ít được ứng dụng trong thú y và y học.

Vấn đề cỏ dại

Trên các cánh đồng, một giống GMO có thể coi là vật gây hại hay cỏ dại khi nó tiếp tục sinh trưởng ở các vụ sau và cạnh tranh với các cây chính vụ. Nếu giống thực vật này được biến đổi di truyền để chống chịu các loại thuốc diệt cỏ thì vấn đề cỏ dại rất khó được kiểm soát và cần phải chuẩn bị các biện pháp, thuốc diệt cỏ thay thế. Tuy nhiên, thông thường các giống cây lương thực đã được thuần hóa đến mức chỉ có khả năng sinh sống trên các cánh đồng đã được canh tác thích hợp nên khả năng trở thành một loài thực vật gây hại là không lớn. Do đó, mối nguy hại này chỉ thực sự xuất hiện đối với các loài cây chuyển gen có khả năng tự sinh sản và ít được thuần hóa như cỏ linh lăng, thông, dương, bạch đàn...

Vấn đề di ứng protein lạ trong thực phẩm chuyển gen

Những đánh giá về an toàn thực phẩm này dựa trên những quy định của các tổ chức có thẩm quyền của mỗi nước và bao gồm: hướng dẫn sản phẩm, thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hoá sinh, độc tính, dinh dưỡng và khả năng gây dị ứng. Về vấn đề an toàn thực phẩm GMOs: "Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với các thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với việc đánh giá các thực phẩm khác. Quá trình đánh giá an toàn thực phẩm chuyển gen mang lại tất cả các lợi ích như thực phẩm thông thường và không có thêm một tác hại nào".

3.7.2. Cơ chế quản lý rủi ro

Vấn đề quản lý rủi ro trong CNSH nông nghiệp là việc áp dụng các quy trình và phương pháp để làm giảm các tác động có hại của một rủi ro xuống đến mức có thể chấp nhận được. Trong thực tế, khả năng kiểm soát được các rủi ro tiềm tàng hoặc đã xác định có thể áp dụng từ quá trình phát triển và thử nghiệm GMOs.

3.7.2.1. Quy mô phòng thí nghiệm

Bằng cách tuân thủ nghiêm ngặt các quy trình thí nghiệm và tiêu chuẩn ATSH, các cây trồng và tế bào chuyển gen có thể được kiểm soát trong PTN, các thiết bị nuôi cấy mô, và phòng nuôi trồng. Cây trồng có thể được quản lý tương đối dễ dàng trong điều kiện PTN với lưu ý đặc biệt về việc thu nhặt kỹ lưỡng hạt được tạo ra từ cây trong PTN hoặc phòng nuôi để loại bỏ hoặc phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

3.7.2.2. Quy mô nhà kính

Các nhà kính được thiết kế để giữ các cây trồng ở bên trong cách ly với côn trùng và động, thực vật

khác bên ngoài. Tùy thuộc mục đích thí nghiệm và đặc điểm GMOs liên quan đến các loại, mức độ ATSH khác nhau mà người ta tiến hành thiết kế nhà kính với các chi tiết và quy trình xây dựng phù hợp. Trong đa số trường hợp, các nhà kính thông thường có thể sử dụng để nuôi trồng GMOs bằng cách tân trang và nâng cấp hệ thống kính. Các nhà kính hiện nay, kể cả các nhà kính hiện đại nhất cũng không ngăn cản hoàn toàn sự phát tán của hạt phấn. Việc phòng ngừa sự phát tán của hạt phấn đòi hỏi các trang thiết bị chuyên biệt và rất đắt so với khả năng tài chính của hầu hết các Viện nghiên cứu trên thế giới.

3.7.2.3 Quy mô đồng ruộng

Trước khi sản phẩm được đưa ra thị trường, GMCs thường được thử nghiệm ở quy mô đồng ruộng. Nghiên cứu thử nghiệm đồng ruộng nhằm xác định khi sản phẩm đưa vào sản xuất, tiêu thụ có những ảnh hưởng, tác động gì. Đây là giai đoạn thu thập số liệu, hoàn thiện các phương pháp để thu nhận thông tin. Các nhà điều tra luôn luôn tiến hành đánh giá những ảnh hưởng đến quần thể sinh vật đích – ví dụ trong trường hợp GMCs có khả năng sản sinh độc tố thì quần thể sinh vật đích là côn trùng chịu tác động của độc tố này. Tuy nhiên, các nhà đánh giá rủi ro cần quan tâm đến quần thể sinh vật không phải là đích tấn công của độc tố. Quần thể côn trùng này và cách thu thập số liệu được quy định trong các văn bản luật dưới sự giám sát của các cơ quan chính phủ. Trong các nghiên cứu đồng ruộng, thông tin có thể được thu thập một cách trực tiếp (ví dụ bao nhiêu ong hoặc côn trùng có ích khác bị giết) hoặc có thể gián tiếp...

3.7.3. Các thử nghiệm đồng ruộng

Hiện nay ở nước ta, các thử nghiệm đồng ruộng đối với cây bông chuyển gen *Bt* được tiến hành chủ yếu ở khu vực phía Nam. Thống kê trên các địa bàn trồng bông chính thuộc các Chi nhánh, trong vụ Mùa trồng bông nhờ nước trời, năm 2000, giống kháng sâu *Bt* mới chỉ được thử nghiệm, diện tích không đáng kể; đến năm 2001, diện tích đạt 795 ha, chiếm từ 0-10% ở các vùng; và sang năm 2002, diện tích tăng vọt đến 11.717ha, chiếm tỷ lệ từ 14,5 – 87% diện tích ở các vùng và tăng gấp 15 lần so với năm 2001. Nguyên nhân chủ yếu là do các giống bông kháng sâu và các giống bông lai đều kháng sâu cao với một số sâu hại chính trong nước, đồng thời khả năng kháng rầy xanh được cải thiện nhiều so với giống kháng sâu thường, cho năng suất cao và phẩm chất tốt.

Ở Việt Nam, chưa từng có văn bản pháp lí nào liên quan đến thử nghiệm các cây trồng chuyển gen ở quy mô đồng ruộng. Do vậy việc đánh giá rủi ro và quản lý rủi ro cũng chưa từng được triển khai. Tuy nhiên trong quá trình thử nghiệm này, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra tính kháng đối với các loài sâu hại khác và thiên địch, số liệu cho thấy các giống bông chuyển gen không có khả năng kháng đối với sâu xanh da láng, sâu khoang và cũng không ảnh hưởng đến các loài nhện bắt mồi sinh sống trên ruộng bông. Theo các nguồn tin không chính thức, tính kháng sâu của các giống bị giảm dần qua từng vụ với tỉ lệ thấp (quan sát sau 7 vụ)



Hình 61. Sâu cắn chồi ở bông



Hình 62. Cánh đồng bông chuyển gen Bt



Hình 63. Thử nghiệm sinh học cây đu đủ chuyển gen kháng virus đốm vòng



Tại Trại sinh học Thử nghiệm Cổ Nhuế, Viện Công nghệ Sinh học theo nguồn vốn hỗ trợ ODA của Chính phủ Hoa Kỳ đã xây dựng hệ thống nhà kính, nhà lưới và tiến hành thử nghiệm đồng ruộng ở qui mô nhỏ 250 m² cây đu đủ chuyển gen kháng virus đốm vòng.

3.7.4. Kết luận

Cây trồng Bt là công cụ diệt sâu bệnh thực vật mới đã được nghiên cứu rất kĩ về tính an toàn sinh học đối với môi trường cũng như sức khỏe con người. Hiện nay, cây trồng Bt đã được trồng và thương mại hoá trên toàn cầu chủ yếu là ngô, bông và đậu tương. Vào năm 2003, diện tích trồng cây chuyển gen kháng sâu là 12,2 triệu hecta chiếm 18% diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn thế giới. Trong quy mô nhỏ của chuyên đề này chỉ ra các nghiên cứu, điều tra và cơ chế quản lí rủi ro về đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng sâu của các nhóm nghiên cứu khác nhau trên thế giới. Ở Việt Nam vấn đề quan trọng hơn cả là xây dựng và thực thi hướng dẫn các văn bản về ATSH. Xây dựng và thực thi quy chế ATSH cần được tiến hành trên cơ sở hợp tác với các chuyên gia quốc tế và trao đổi thông tin với các nước, đặc biệt là các nước có hệ sinh thái tương tự nhau.

CHƯƠNG 4. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

Trong thời gian 36 tháng từ tháng 10/2001 đến hết tháng 10/2004, đề tài KC.04.13 đã thu được các kết quả sau:

4.1. Kết quả về khoa học

01. Lần đầu tiên đưa các kỹ thuật phân lập gen như phân lập thông qua PCR và phân lập thông qua chức năng protein vào điều kiện phòng thí nghiệm Việt Nam để thực hiện nội dung sưu tập, phân lập và thiết kế gen. Kết quả là đã phân lập được gen *vip* diệt côn trùng cánh cứng, gen *Pi* kháng đạo ôn và thiết kế các gen *vip*, *Pi*, và gen *cry* vào các vectơ pCAMBIA, PBI121 đủ điều kiện để chuyển gen vào cây trồng.

02. Để chuyển gen vào 4 loại cây trồng khác nhau, đã có 11 quy trình công nghệ chuyển gen được hoàn thiện trên cơ sở các kỹ thuật chuyển gen tiên tiến đang được triển khai và hoàn thiện trên thế giới. Đó là 3 quy trình đối với bông vải; 1 quy trình đối với cây hồng; 1 quy trình đối với cây hoa cúc; và 5 quy trình đối với cây lúa. Sử dụng 5 loại gen có tính kháng sâu, kháng rầy nâu, chịu hạn và giữ hoa lâu tàn để chuyển vào các loại cây trồng nêu trên.

03. Trên đối tượng cây bông vải đã hoàn thiện quy trình chuyển gen qua ống phẩn bằng vi tiêm, hoàn thiện ở quy mô nhỏ và đã triển khai ở quy mô rất lớn thu được trên 217000 hạt bông T0 và sàng lọc được nhiều dòng có triển vọng sẽ được nghiên cứu tiếp.

04. Mục tiêu tái sinh cây bông vải qua nuôi cấy tế bào mô sẹo và tạo phôi soma lần đầu tiên đã được lặp lại thành công tại phòng thí nghiệm của Viện CNSH trên hai đối tượng là giống SSR và Cooker, mở ra triển vọng biến nạp nhiều loại gen vào 2 loại giống này để sau đó lai tạo với các giống đang sử dụng trong sản xuất đại trà.

05. Bằng cách hoàn thiện hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây qua cụm chồi, đã mở ra khả năng có thể áp dụng kỹ thuật chuyển gen thông qua cấy mô đối với nhiều giống bông đang trồng đại trà, mở ra triển vọng to lớn khắc phục tình trạng không tái sinh cây trong điều kiện *in vitro* ở đối tượng cây bông.

06. Trên đối tượng cây hồng là cây trồng rừng mọc nhanh đề tài đã hoàn thành các khâu xây dựng hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây, khâu biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn lọc cây chuyển gen. Kết quả là đã thu được những dòng cây hồng sản sinh ra độc tố Cry giết sâu xanh ăn lá.

07. Hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây hoàn chỉnh trên đối tượng hoa cúc được hoàn thiện và đưa vào quy trình chuyển gen *anti-ACO* ức chế sinh tổng hợp ethylene làm cho hoa lâu tàn thu được các dòng cây chuyển gen dương tính thông qua lai phân tử Southern, đang chờ ra hoa để thử tác dụng giữ hoa lâu tàn.

08. Với cây lúa có 3 quy trình chuyển gen khác nhau được xây dựng: (1) Chuyển gen nhờ súng bắn gen; (2) Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn dòng kinh điển bằng kháng sinh hygromycin và (3) Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn dòng bằng manose đảm bảo tạo ra cây chuyển gen "sạch", không chứa gen kháng kháng sinh. Kết quả là đã thu được những dòng lúa kháng rầy nâu, kháng sâu đục thân và có khả năng chịu hạn thông qua chuyển các gen đặc dụng.

09. Về kỹ thuật đánh giá cây chuyển gen ở mức Phòng thí nghiệm và ở quy mô có kiểm soát, đã xây dựng được các kỹ thuật sinh lý như nảy mầm hay cấy mô trên môi trường chứa kháng sinh, tạo vết cháy trên lá; sinh hoá như thử ELISA, bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như: PCR, lai Southern, lai Northern và Western.

10. Các cây chuyển gen đang được trồng trong nhà kính an toàn côn trùng để thử sinh học hoạt tính gen, theo dõi hoạt động của gen chuyển và tính ổn định di truyền của chúng ở các thế hệ tiếp theo. Điều

nổi bật là đã thông qua nguồn vốn khác xây dựng được hệ thống nhà kính, nhà lưới thử nghiệm cây trồng chuyển gen quy mô tổng cộng gần 400 m².

11. Việc đánh giá an toàn sinh học mới chỉ dừng ở 2 mức: Một là xây dựng phương pháp đánh giá an toàn sinh học của cây chuyển gen kháng sâu ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô nhà lưới; Hai là xây dựng cơ sở khoa học và qui trình đánh giá an toàn sinh học cây chuyển gen kháng côn trùng

12. Đề tài có 3 đề xuất về hướng sử dụng: (1) Các loại gen được trao đổi thông qua các loại văn bản pháp lý để những phòng thí nghiệm trong nước có thể sử dụng vào mục đích nghiên cứu. (2) Nguyên liệu chuyển gen được sử dụng làm giống trực tiếp hay sẽ làm nguyên liệu tạo giống thông qua các phép lai hữu tính tiếp theo được phối hợp tiến hành với cơ quan nghiên cứu tạo và sản xuất giống cây trồng. (3) Quy trình công nghệ, tài liệu hướng dẫn dùng cho cơ sở nghiên cứu, cơ sở giảng dạy thông qua thoả thuận giữa cơ quan chủ trì và cơ quan hoặc người sử dụng.

4.2. Kết quả nổi bật và khả năng áp dụng

Bảng 1. Báo cáo tóm tắt kết quả thực hiện từ 10/2001 - 10/2004

TT	Tên sản phẩm	Số lượng	Chỉ tiêu Kinh tế - kỹ thuật	Kết quả đạt được
1	Bộ sưu tập gen có ích	12	- Các chỉ tiêu biểu thị gen được chuyển nạp (tỷ phần gen cần chuyển, các gen đặc trưng) - Các chỉ tiêu an toàn sinh học	Hoàn thiện việc thiết kế các gen <i>cryIA(b)</i> , <i>cryIA(c)</i> , <i>GNA</i> , <i>ACO</i> , <i>Pi-1</i> , <i>Pi-2t</i> , <i>vip</i> , <i>OAT</i> , <i>TPS</i> , <i>P5CS</i> , <i>nhaA</i> , <i>Xa21</i>
2	Cây trồng được chuyển gen thành công Thử nghiệm trong sản xuất Thu dòng ổn định di truyền gen chuyển	4 loại 86 dòng Chưa có		Bốn loại cây trồng đã chuyển gen: Lúa, bông vải, hoa cúc và Hồng. - 37 dòng lúa T2 (giống lúa IR64) mang gen <i>cry</i> - 5 dòng lúa T4 (C71) mang gen <i>cry</i> trong đó có 1 dòng có tính kháng sâu đục thân cao - 6 dòng bông T2 mang gen <i>cry</i> của các giống 254 - 4 dòng cây Hồng mang gen <i>cry</i> - 14 dòng hoa cúc mang gen <i>ACO</i> - 20 dòng hoa cúc mang gen <i>cry</i> Các dòng lúa và bông vải T2 mang gen <i>cry</i> - 27 dòng lúa T2 (giống lúa IR64) mang gen <i>cry</i> - 1 dòng lúa T4 (C71) mang gen <i>cry</i> có tính kháng sâu đục thân cao
3	Công nghệ chuyển gen cho cây trồng Việt Nam			- Chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm đối với cây bông - Chuyển gen thông qua <i>Agrobacterium</i> đối với cây lúa, cây hồng và hoa cúc

Đề tài đã hoàn thành tốt như đã ký trong HĐ số 13/2001/HĐ-ĐTCT-KC04.13 cho năm 2004, cụ thể như sau:

1. Đã phân lập được các gen *vip* có phổ diệt côn trùng rộng và thiết kế thành công các gen này vào vector chuyển gen pBI121 để phục vụ công tác chuyển gen vào các đối tượng cây trồng đặc biệt là cây bông vải.
2. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã xây dựng thành công hệ thống tái sinh ở cây bông vải từ phôi soma.
3. Hoàn thiện quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* vào hầu hết các đối tượng cây trồng của đề tài (cây lúa, cây hoa cúc và cây Hồng).
4. Xây dựng quy trình chuyển gen ở cây bông vải bằng phương pháp vi tiêm vào bầu noãn.

5. Kết quả đề tài đã nhận được 4 loại cây trồng chuyển gen vượt kế hoạch so với đăng kí trong hợp đồng là một loại và nhận được 28 dòng lúa chuyển gen T2, và T4 tương đối ổn định về mặt di truyền.
6. Làm chủ được các phương pháp chẩn đoán cây chuyển gen: PCR, lai Southern, Northern, Western, Elisa, thử kháng sinh, thử tính chịu hạn, chịu mặn và thử sâu của các dòng chuyển gen.

4.3. Trình độ công nghệ

- Trình độ công nghệ về phân lập, thiết kế gen và chuyển gen vào thực vật đã đạt trình độ quốc tế.
- Lần đầu tiên ở Việt Nam đã hoàn thiện phương pháp tái sinh cây bông vải thành công từ phôi sôma tiến tới phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây bông vải thông qua *Agrobacterium*
- Các phương pháp đánh giá cây chuyển gen đã đạt trình độ quốc tế, số liệu, hình ảnh, bảng đáng tin cậy.
- Các kết quả nghiên cứu thu được đã khẳng định trình độ của các cán bộ khoa học nước ta trên lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại ngang tầm với các nước trong khu vực và thế giới. Các kết quả thu được vừa có ý nghĩa khoa học và vừa có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc cải tiến giống cây trồng.

4.4. Khả năng áp dụng

Bảng 2. Khả năng áp dụng

TT	Tên tiến bộ kỹ thuật	Cơ quan tạo ra	Nơi được chuyển giao	Hiệu quả kinh tế	Pháp lý cho việc áp dụng
1	Các gen và các vector chuyển gen	Viện Công nghệ Sinh học	- Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Chuyển gen có ích vào cây trồng nhằm nâng cao sức chống chịu sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi	Sẽ đăng ký quyền tác giả
2	Công nghệ chuyển gen	Các Viện	- Các Sở KHCN các tỉnh - Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Tạo giống cây trồng chuyển gen	
3	Quy trình nuôi cấy mô tái sinh cây bông, cây Hồng, cây Hoa cúc, cây lúa	Các Viện	- Các Sở KHCNMT các tỉnh - Các Viện nghiên cứu và các phòng thí nghiệm tạo giống khác	Sử dụng cho công nghệ chuyển gen và nhân nhanh cây	Sẽ đăng ký quyền tác giả
4	Dòng cây chuyển gen kháng sâu	Các Viện	Cơ quan tạo giống cây trồng	Lai tạo giống chống chịu sâu bệnh	Sẽ đăng ký quyền tác giả
5	Phương pháp phân tích cây chuyển gen	Các Viện	Các phòng thí nghiệm quan tâm	Chuyển giao công nghệ	

4.5. Đào tạo

Bảng 3. Danh sách các học viên được đào tạo

STT	Năm	Họ tên	Tên luận án	Bậc đào tạo
Đào tạo Tiến sĩ				
1	2001	Đặng Trọng Lương	<i>Hoàn thiện quy trình chuyển gen kháng sâu vào cây bắp cải nhờ vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens</i>	Tiến sĩ
2	2003	Nguyễn Hữu Hồ	Nghiên cứu sử dụng mô tế bào có khả năng sinh phôi để tạo cây lúa chuyển gen kháng sâu bằng phương pháp bắn gen và phương pháp dùng vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tiến sĩ
3	2004	Nguyễn Thị Tâm	Nghiên cứu khả năng chịu nóng và chọn dòng chịu nóng ở lúa bằng công nghệ tế bào thực vật	Tiến sĩ

4	2006	Điêu Thị Mai Hoa	Nghiên cứu một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử liên quan đến tính trạng chín tập trung của đậu xanh	Tiến sĩ
5	2006	Trịnh Minh Hợp	Xây dựng hệ thống tái sinh và chuyển gen vào cây bông thông qua <i>A.tumefaciens</i>	Tiến sĩ
Đào tạo Thạc sĩ				
1	2002	Lâm Đại Nhân	Phân lập và thiết kế gen mã hóa protein vỏ virus gây bệnh đốm vòng ở đu đủ Việt Nam	Thạc sĩ
2	2003	Nguyễn Thị Thu Hằng	Phân tích cây lúa C71 chuyển gen <i>Xa21</i> và gen <i>TPS</i>	Thạc sĩ
3	2004	Phạm Bích Ngọc	Nghiên cứu phương pháp chuyển gen vào cây khoai lang thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i> và bước đầu phân lập gen có tính kháng bọ hà	Thạc sĩ
4	2004	Nguyễn Hải Yến	Nghiên cứu hoàn thiện hệ thống chuyển gen ở lúa	Thạc sĩ
5	2004	Đoàn Thu Thủy	Phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen	Thạc sĩ
6	2005	Phạm Quang Chung	Nghiên cứu phân lập và thiết kế vectơ gắn hai gen kháng đạo ôn <i>Pi-1</i> và <i>Pi-2(t)</i> ở giống lúa Tê tép của Việt Nam	Thạc sĩ
7	2004	Đinh Thị Xuyên	Nghiên cứu tính đa hình ADN của các dòng vải thiếu Thanh Hà bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Thạc sĩ
Đào tạo Cử nhân				
1	2001	Trần Mỹ Linh	Thiết kế Ti-plasmid mang gen ACC Oxydaza phục vụ cho chuyển gen vào cây đu đủ	Cử nhân
2	2002	Nguyễn Trung Nam	Sàng lọc chủng Bt và tinh sạch protein Vip kháng bọ hà khoai lang	Cử nhân
3	2002	Trương Thu Thủy	Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây bông phục vụ chuyển gen	Cử nhân
4	2003	Nguyễn Hoàng Nam	Phân tích cây bông kháng sâu bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Cử nhân
5	2003	Phạm Thị Trà	Xây dựng thư viện DNA genom của chủng Bt có hoạt tính kháng bọ hà ở khoai lang	Cử nhân
6	2003	Giang Thu Thủy	Nghiên cứu kỹ thuật chuyển gen anti-ACO vào cây hoa cúc nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cử nhân
7	2004	Lê Thị Hồng Ngọc	Phân lập gen vip3 từ chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> AB51 để tiến tới thiết kế vector chuyển gen vào cây trồng	Cử nhân
8	2005	Nguyễn Thu Trang	Tách dòng và đọc trình tự đoạn ADN liên kết với gen kháng đạo ôn <i>Pi-1</i> ở giống lúa Monobenkan của Việt Nam	Cử nhân
9	2005	Hân Thị Dung	Tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang gen mã hóa cho protein vỏ vi rút đốm vòng để chuyển vào cây đu đủ	Cử nhân
10	2005	Hoàng Xuân Sính	Thiết kế vectơ T-plasmid mang gen GlyP mã hóa kháng nguyên glycoprotein của vỏ virus đại phục vụ chuyển gen thực vật	Cử nhân

Bảng 4. Danh sách các cán bộ được nâng cao trình độ

STT	Thời gian đào tạo	Họ tên	Nội dung đào tạo	Cơ quan
1	10/2002-6/2003	Thái Thị Lệ Hằng	Kỹ thuật sinh học phân tử phân tích cây chuyển gen	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
2	5/2004-11/2005	Nguyễn Thị Dung	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
3	12/2001-6/2002	Phạm Minh Loan	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện KHKTNN VN
4	12/2001-6/2002	Đoàn Thu Thủy	Các phương pháp phân tích cây chuyển gen	Viện KHKTNN VN
5	12/2001-6/2002	Nguyễn Văn Huế	Kỹ thuật chuyển gen ở cây bông bằng vi tiêm vào bầu noãn	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
6	6/2003-3/2004	Nguyễn Thị Nhã	Kỹ thuật nuôi cấy và tái sinh cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ
7	6/2002-12/2006	Trịnh Minh Hợp	Các kỹ thuật tái sinh và chuyển gen ở cây bông	Viện NC Cây bông & CCS, Nha Hồ

4.6. Sản phẩm khoa học của đề tài

1. Suu tập gen *cryIA/b,c*, *ACO*, *GNA*, *Xa21*, *OAT*, *P5CS*, *TPS*, *nhaA* dùng để chuyển vào cây trồng: 9 gen.
2. Phân lập được Gen *Pi-1*, *Pi-2t*, *vip*: 3 gen.
3. Quy trình chuyển gen ở lúa bằng *Agrobacterium*: 2 quy trình.
4. Quy trình chuyển gen ở lúa bằng súng bắn gen: 1 quy trình.
5. Quy trình thử sâu đục thân hai chấm hại lúa: 1 quy trình
6. Quy trình đánh giá và nhận biết cây lúa chuyển gen: 1 quy trình
7. Dòng lúa chuyển gen *cryIAc* kháng sâu đục thân: 42 dòng.
8. Quy trình tái sinh cây Bông theo đa chồi (cho 9 giống) và mô sẹo (cho giống SSR60F và Cooker): 2 quy trình.
9. Quy trình chuyển gen vào bông bằng tiêm qua bầu nhụy: 1 quy trình.
10. Cây bông chuyển gen kháng sâu bằng phương pháp vi tiêm: 6 cây
11. Quy trình chuyển gen ở cây hồng: 1 quy trình
12. Dòng cây Hồng chuyển gen *cryIA(c)*: 4 dòng
13. Quy trình nuôi cấy mô và chuyển gen vào hoa cúc: 1 quy trình.
14. Dòng cây hoa cúc chuyển gen *anti-ACO*: 14 dòng.
15. Dòng cây hoa cúc chuyển gen kháng sâu: 20 dòng
16. Phương pháp phân tích cây chuyển gen phòng thí nghiệm: 4/4 phương pháp: PCR, lai Southern, Northern, Western
17. Phương pháp chẩn đoán cây chuyển gen: thử kháng sinh, thử sâu và thử tính chịu mặn, hạn
18. Đào tạo cử nhân: 10 cử nhân.
19. Đào tạo cao học: 7 Thạc sỹ.
20. Đào tạo Tiến sỹ: 5 nghiên cứu sinh.
21. Đào tạo tại nước ngoài: 4 cán bộ.
22. Đào tạo nâng cao trình độ trong nước: 7 cán bộ.
23. Báo cáo khoa học: 7 báo cáo.
24. Công trình công bố: 13 bài báo
25. Những đóng góp khác của đề tài: tham gia viết tài liệu gồm (i) Mẫu Thỏa thuận chuyển giao nguyên vật liệu gen; (ii) Sách mỏng và (iii) 12 tờ tài liệu để phổ biến về an toàn sinh học và lợi ích của cây trồng chuyển gen

4.7. Danh sách các Công trình công bố

1. Trần thị Cúc Hoà, Lê Trần Bình, Bùi Bá Bổng (2003). *Tiêu chuẩn hoá hệ thống chọn lọc mannose và ứng dụng hệ thống chuyển nạp trong chuyển nạp gen hữu dụng bằng Agrobacterium ở lúa*. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
2. Trần thị Cúc Hoà, Lê Trần Bình, Bùi Bá Bổng (2004). *Chuyển gen kháng côn trùng *cryIA(b)* và *cryI**

- A(c) vào một số giống lúa bằng *Agrobacterium* và sử dụng hệ thống chọn lọc manose. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. 6: 821-823.
3. Phạm Quang Chung, Lê Trần Bình, Nguyễn Đức Thành (2003). Tách dòng và đọc trình tự gen kháng đạo ôn *Pi-1(t)* từ giống lúa C101A51. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 1: tr. 65 - 70.
 4. Lê Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2003). Cây trồng biến đổi di truyền: Thực trạng và triển vọng, Tạp chí Công nghệ Sinh học. 1: tr. 265 - 285.
 5. Phạm Thị Trà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Mùi (2003). Xây dựng thư viện gen từ chủng *Bacillus thuringiensis* Ab51 có hoạt tính kháng bọ hà. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 6. Trương Thu Thủy, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyến (2003). Nghiên cứu quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) từ phôi. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 7. Trương Thu Thủy, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Lê Quang Quyến. (2003). Xây dựng quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) bằng cách tạo đa chồi. Tạp chí Di truyền và ứng dụng. Tập 2. Trang 45-51.
 8. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 9. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). Tạo cây Hồng (*Paulownia fortunei*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội.
 10. Nguyễn Thị Hồng Châu, Nguyễn Phương Thảo, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội. (2003). Chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* vào giống lúa C71. Tạp chí CNSH. 1: tr. 219 - 226
 11. Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng Châu, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình. (2004). Phân tích các dòng cây lúa C71 chuyển gen TPS. Đã gửi đăng ở Tạp chí CNSH
 12. Đoàn Thu Thủy, Hồ Hữu Nhị (2004). Phương pháp nhận biết và đánh giá cây chuyển gen. Đã gửi đăng ở Tạp chí CNSH.
 13. Nguyễn Thị Lan Hoa, Doãn Thị Hoà, Đặng Trọng Lương, Vũ Đức Quang, Phí Công Nguyên, Đặng Thị Minh Trang, Đỗ Minh Huy. Những kết quả bước đầu chuyển gen *anti-ACO* vào cây hoa cúc. Tạp chí CNSH ứng dụng, số 2+3/2003, tr 20-25.

4.8. Hạn chế của đề tài

Ngoài những kết quả vượt mức đăng ký so với thuyết minh và hợp đồng nghiên cứu, đề tài còn có một số nội dung chưa hoàn thành sau:

- Với nội dung tạo cây lúa chuyển gen kháng bệnh bạc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* đã thu được 13/41 dòng cây có tính kháng bệnh bạc lá theo phân cấp tiêu chuẩn của IRRI. Tuy nhiên, kết quả phân tích PCR cho thấy đã không nhận được dòng cây nào còn mang gen *Xa21*, có thể do kích thước gen quá lớn.
- Tạo cây lúa chuyển gen kháng bệnh đạo ôn thông qua *Agrobacterium* hay súng bắn gen. Hiện đề tài đã hoàn thành việc phân lập gen, thiết kế vector chuyển gen mang gen *Pi* kháng bệnh đạo ôn. Sắp tới đề tài sẽ tiến hành chuyển gen kháng bệnh đạo ôn vào cây lúa C71.
- Do chưa có một văn bản pháp lý về Quản lý An toàn sinh học các sinh vật biến đổi gen thông qua nên ở thời điểm này đề tài chưa mở rộng việc thực hiện được các thử nghiệm ngoài đồng ruộng cho các cây trồng chuyển gen.
- Về tình hình sử dụng kinh phí của đề tài còn lại 73.522.250 đồng của mục 115 - Đoàn ra chưa chi hết, đề nghị được phép sử dụng số kinh phí tiết kiệm cho phát triển tiềm lực KHCN của đơn vị.

CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

1. Phân lập được gen *vip3* từ chủng *Bacillus thuringiensis* AB51, gen *Pi-2t* từ giống lúa C101A51 và *Pi-1t* từ giống lúa tẻ tép và thiết kế thành công được vector chuyển gen pBI121 mang cấu trúc 35s/*vip3*/NOST.
2. Xây dựng hệ thống tái sinh 7 giống bông Việt Nam và 2 giống SSR60F và Cocker phục vụ chuyển gen, trong đó đã tái sinh được giống bông SSR60F và giống Cocker thông qua mô sẹo và đã hoàn thiện quy trình tái sinh thông qua tạo đa chồi cho 9 giống bông phục vụ chuyển gen.
3. Hoàn thiện quy trình nuôi cấy mô cây Hồng, cây Hoa cúc và cây lúa và đã sử dụng để chuyển gen.
4. Xây dựng được các quy trình chuyển gen hữu hiệu: thông qua *Agrobacterium* đối với cây lúa, cây Hồng và cây Hoa cúc, sử dụng máy bắn gen đối với cây lúa và quy trình chuyển gen bằng vi tiêm trực tiếp vào noãn hoa qua ống phấn đối với cây bông vải.
5. Đặc biệt xây dựng phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* và hệ thống chọn lọc bằng mannose (thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hoặc thuốc trừ cỏ).
6. Thu được tổng cộng trên 210.000 hạt bông sau tiêm chuyển gen kháng sâu và 4000 hạt sau tiêm chuyển gen chịu hạn. Bước đầu sàng lọc được 11.000 hạt T1 của 3 giống D16-2, VN36-P, MUC9 chuyển gen kháng sâu.
7. Kết quả cho đến nay, đề tài tạo được 86 dòng cây chuyển gen làm vật liệu cho nghiên cứu tạo giống hoặc được sử dụng để nghiên cứu tạo giống trực tiếp bao gồm:
 - 37 dòng lúa chuyển gen T2 giống IR64 và 5 dòng lúa T4 giống C71.
 - 4 dòng cây Hồng chuyển gen T0 mang gen *cryIA(c)*.
 - 14 cây hoa cúc T0 mang gen *anti-ACO* và 20 cây hoa cúc T0 mang gen *cryIA(c)*.
 - 6 dòng bông T2 chuyển gen *cryIA(c)* giống 254
- Bằng các kỹ thuật sinh học và sinh học phân tử chúng tôi đã xác định được các gen này hiện diện trong các dòng cây chuyển gen và các gen chuyển đã hoạt động và biểu hiện tính trạng rất rõ rệt.
8. Xây dựng được quy trình nhận biết và đánh giá cây chuyển gen quy mô từ phòng thí nghiệm đến nhà lưới cho các đối tượng cây trồng như cây lúa, bông, hồng và hoa cúc.
9. Đề tài đã công bố được 13 bài báo, đang in 1 sách, đã in 12 tài liệu phổ biến, đào tạo được 5 NCS, 7 thạc sĩ và 10 cử nhân.

5.2. Đề nghị

Để có thể tiếp tục phát triển tiếp các kết quả nghiên cứu, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị như sau:

1. Tiến hành chuyển gen kháng sâu *vip3* vào cây bông vải và một số đối tượng cây trồng khác như đậu tương, ngô thông qua *Agrobacterium*.
2. Sớm được thử nghiệm đồng ruộng các dòng lúa chuyển gen kháng sâu và bước đầu đánh giá mức độ an toàn của cây chuyển gen với sinh thái và môi trường.
3. Việc tạo các cây trồng chuyển gen là một bước tiến bộ khoa học và kỹ thuật rất lớn với khả năng ứng dụng rộng rãi phục vụ cho sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học Việt nam nay có đủ khả năng để tham gia vào lĩnh vực nghiên cứu này, đề nghị Bộ Khoa học và Công nghệ cần tiếp tục hỗ trợ tiếp kinh phí cho đề tài để mở rộng các kết quả trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Đặng Trọng Lương, Nguyễn Đức Doanh, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đống, Trần Duy Quý (1999). Nghiên cứu chuyển gen *cryIAC* kháng sâu vào một số giống cải bắp (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) qua *Agrobacterium*. Báo cáo khoa học. Viện Di truyền Nông nghiệp
2. Đoàn Thị Ái Thuần, Vũ Ngọc Phượng, Thái Xuân Du, Nguyễn Văn Uyển (2001). Nhân giống vô tính cây Hồng (*Paulownia fortunei*) bằng nuôi cấy mô. *Sách Công nghệ Sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững*. tr. 63-68.
3. Dự án UNEP-GEF (2003). Điều tra các cơ chế hiện có nhằm thống nhất quá trình đánh giá và quản lý rủi ro, sự công nhận giữa các bên về số liệu và xử lý số liệu. Viện Công nghệ Sinh học.
4. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). Tạo cây hồng (*Paulownia fortunei*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 16-17/12/2003. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật (Hà Nội), tr. 1088-1090.
5. Nguyễn Đức Doanh (1998). Tổng quan về cây chuyển gen từ năm 1986-1997. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
6. Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Trần Thị Dung, Nguyễn Văn Uyển (2001). Tạo cây thuốc lá chuyển gen kháng sâu, kháng thuốc trừ cỏ thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và khảo sát sự di truyền các tính trạng nói trên ở thế hệ T₁. *Công nghệ sinh học và nông nghiệp sinh thái bền vững*. NXB Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 16-21.
7. Nguyễn Trung Nam, Vũ Đình Hoà, Đinh Sơn Quang, Nguyễn Thị Bích Thuỷ, Võ Thị Thứ, Lê Trần Bình (2000). Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ cho việc phân lập gen kháng bọ hà ở khoai lang, *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học năm 2000-2001*, Tr. 206-216.
8. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 16-17/12/2003. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật (Hà Nội), tr. 1088-1090.
9. Phan Tố Phượng, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý, Phạm Thu Hằng, C.M. Clauder, S. Zang, L. Chen, R.N. Beachy (2001). Chuyển gen kháng Hygromycin, gen GUS và gen kháng bệnh bạc lá Xa21 vào lúa bằng súng bắn gen. Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000. Viện Di truyền Nông nghiệp.
10. Trần Bích Lan, Nguyễn Đức Doanh (1998). Kết quả bước đầu sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* trong nghiên cứu chuyển gen vào lúa ở Việt Nam. Báo cáo trong hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa. Huế, tháng 5/1998.
11. Võ Thị Thứ (1996). Nghiên cứu DNA plasmid, gen mã hóa sự tổng hợp tinh thể protein của các chủng *Bacillus thuringiensis*, *Tạp chí sinh học*, số 3, tr. 23-25.
12. Lê Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). Cây trồng biến đổi di truyền: Thực trạng và triển vọng, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 1: tr. 265 – 285
13. Phạm Thị Trà, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Mùi (2003). Xây dựng thư viện gen từ chủng *Bacillus thuringiensis* Ab51 có hoạt tính kháng bọ hà. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
14. Trương Thu Thuỷ, Nguyễn Hữu Cường, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Trịnh Minh Hợp, Lê Quang Quyền (2003). Nghiên cứu quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) từ phôi. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
15. Trương Thu Thuỷ, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Lê Quang Quyền (2003). Xây dựng quy trình tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum*) bằng cách tạo đa chồi. *Tạp chí Di truyền và ứng dụng*. Tập 2. Trang 45-51.
16. Nguyễn Văn Uyển, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro cây Hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyển gen. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
17. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003). Tạo cây Hồng (*Paulownia fortunei*) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*.
18. Nguyễn Thị Hồng Châu, Nguyễn Phương Thảo, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (2003). Chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* vào giống lúa C71. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 1: tr. 219 - 226

Tài liệu Tiếng Anh

19. A Selvapandian, N. Arora, R. Rajagopal, S. K. Jalali, T. Venkatesan, S. P. Singh, and Raj K. Bhatnagar (2001). "Toxicity Analysis of N- and C- Terminus- Deleted Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis*", *Applied and Environment Microbiology*, Vol. 67, No. 12, pp. 5855-5858.

20. Alderman RR, Hodges TK. (1996). *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica indica rice varieties*. Planta. 199: 612-617.
21. An, G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988). Binary Vectors In: Gelvin SB, Schilperoot RA, Verma DPS (eds) Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 1-19.
22. Anatole F. K. (1997). Insects Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries, *ISAAA Briefs* (1997).
23. Ausubel F. et al (1989). Current protocols in molecular biology. NewYork: Greene Publishing Associates.
24. *Bacillus thuringiensis*, <http://www.helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm#crest>, The Microbial World.
25. Bonman, J. M., Estrade, B. A., Kim, C. K., and Lee, E. J., (1991). "Assessment of blast disease and yield loss in susceptible and partial resistance ricecultivars in two irrigated lowland environments". Plant disease, PP.75.
26. C. G. Yu, M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel, J. J. Estruch (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects", *Appl. Environ. Microb*, No. 63, pp. 532-536.
27. Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. S. Wu, J. H. Xiao, Z. H. Yu, P. C. Ronald, S. E. Harrington, G. Second, S. McCouch and S. D. Tanksley (1994). Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetic.*, 138: 1251-1274.
28. Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nestor EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3672-3676.
29. Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources, *Sci Sinica* 18: 659-668.
30. Crickmore T. R., D. R. Zeiler (1998). "Revision of the nomenclature for the *B.t* pesticidal crystal protein", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No 7, pp. 807-813.
31. Datta K, Vasquez Z, Tu J, Tonlzo I, Alam MF, Oliva N, Abugo E, Khush GS, Datta SK. (1998). Constitutive and tissue specific differential expression of the *cryI (A)b* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pests. *Theor Appl Genet.* 97: 20-30.
32. Delannay X, LaVallee BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Marrone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG, Fischhoff DA (1989). Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var 'kurstaki' insect control protein. *Bio/Technology* 7:1265-1269
33. Duan X, Li X, Xue Q, Abo E.I, Sand M, Xu D, Wu R. (1996). Transgene rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnol* 14: 494-498.
34. E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D.H. Dean (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein", *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol. 62, No. 3, pp. 775-806.
35. Edmonds H.S., Gatehouse L.N., Hilder V.A., Gatehouse J.A. (1996). the inhibitory effects of the cysteine protease inhibitors, oryzacystatin, on digestive protease and on larval survival and development of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howard*), *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 78, pp. 83-94.
36. Estruch J. J., Warren G. W., Mullins M. A., Nye G. J., Craig J. A., Koziel M. G. (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, No.93, pp. 5389-5394.
37. Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*.12: 883-888.
38. Fukuoka, S. and K. Okuno. (2001). *QTL analysis and mapping of pi21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice*. *Theoretical Applied Genetic*, 103: 185-190.
39. Geert Angenon, Willy Dillen, and Marc Van Montagu. Laboratorium voor Genetica. Univeristiteit Gent. B-9000 Gent. Belgium. Antibiotic resistance marker for plant transformation.
40. Gregory W. Warren, Michael G. Koziel, Martha A. Mullins, Gordon J. Nye (1995). Method for isolating vegetative insecticidal protein genes, United States Patent, Patent number 5866326.
41. Grochulski P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai- Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(c) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation", *J. Mol. Biol.*, No. 254, pp. 447-464.
42. Gunasekaran M., Weber D.J., "Molecular biology of the biological control of pest and diseases of plants", CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 105-122.
43. Hari C. Sharma, Kiran K. Sharma, Nadoor Seetharama, Rodomiro Ortiz (2000). "Prospects for using transgenic

- resistance to insects in crop improvement", *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, [http:// www.ejbiotechnology.info/content/ vol3/ issue2/full/3/bip/](http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue2/full/3/bip/).
44. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282.
45. Hittalmani, S., Reini, S., Mew, T., Rodriguez, R. L., and Huang, N. (1994). Identification of blast resistance gene *Pi-2(t)* via specific primer amplified genomic DNA. *Theoretical Applied Genetic*, 91: 9-14.
46. Hoa TTC and Bong BB (2003). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of indica (*Oryza sativa* L.) using manose selection system. *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*: 1+2 : 60-63.
47. Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I Beyer P. (2003). Golden Indica Japonica Rice Lines Amenable to Deregulation. *Plant Physiol.* 133: 161-169
48. Hoekema A, Roelvin PW, Hooykaas P J J, Schilperoort RA. (1984). Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *EMBO J.* 3: 2485-2490.
49. Hofte H., Whiteley H. R. (1989). "Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*", *Microbial Rev.*, No.53, pp. 242-255.
50. Ion exchange chromatography - Principles and Methods. Amersham Pharmacia biotech, pp 11-13.
51. J. Li, J. Carroll, D. J. Ellar (1991). "Crystal structure of insecticidal - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution", *Nature*, 353, pp. 815-821.
52. Jame Clive. (2003). Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops. ISAAA Briefs No. 30. ISAAA, pp 3-4.
53. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
54. Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Peterson SG, Brunstedt J and Okkels FT. (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4: 111-117
55. John Bennett. Genes for crop Improvement. Division of Plant Breeding, Genetics and Biochemistry. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
56. Kumar PP, Rao DC, Goh C-J (1988). Influence of petiole and lamina on adventitious shoot initiation from leaf of *Paulownia fortunei*. *Plant Cell Rep.* 17: 886-890
57. Li J., P. A. Koni, D. J. Ellar (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and implications for membrane pore formation", *J.Mol. Biol.*, No.257, pp. 129-152.
58. Li L, Qu R, Kochko de A, Fauquet C, Beachy RN (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12:250-255
59. Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology* 13:686-691
60. M. M. Lecade et al (1996). Colletion of *B.t.* No.1, IEBC Catalog, Paris.
61. McCouch SR, Kocheher G, Yu ZH, Wanh ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD, (1988). Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 78: 815-829.
62. Miles JS and Guest JR. (1984). Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene of *Escherichia coli*. *Gene* 32: 41-48.
63. Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 18: 473-497.
64. Nagato, Y. and A. Yoshimura (1998). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genetic National*, 15: 13-74.
65. Nancy L. Mathis and Maud A.W. Hinchee (1994). *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissue. Crop Transformation. Monsanto Co. St. Louis. MO63198. USA.
66. Nayak P, Basu D, Das S, Basy A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK. (1997). Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAc delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant again yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2111-2116
67. Niels J. Galjart, Natarajan Sivasubramainian, and Brian A. Federici (1987). "Plasmit Location, Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding a 27.3- Kilodalton Cytolytic Protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14)", *Current Microbiology*, No.16, pp. 171-177.
68. Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939-943
69. Pual J.J. Hookykas, Teresa Mozo (1994). *Agrobacterium* molecular genetics. Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, p1-9B3.

70. Saghai Maroof M. A., Biyashev R. M., Yang G. P., Zhang Q., R. W. Allard (1984). *Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics*. Process National Academic Science. USA 91: 5466-5470.
71. Sambrook, J. and Russell, D. W., (2001). *Molecular Cloning*, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
72. Seungil Han, Joyce A.Craig, Christopher D. Putnam, Nadine B. Carozzi, Jonh A. Tainer (1999). "Evolution and mechanism from structure of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex", *Nature structural biology*, Vol. 6, No. 10, pp. 932-936.
73. Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM (1996). Selection of large quantities of embryogenic calli from *indica* rice seeds for production of fertile transgenic plants using biolistic method. *Plant Cell Rep* 15:322-327
74. Stanton B. Gelvin, Chang - Nong Liu (1994). Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. *Plant molecular biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, 1994, p1-9B3.
75. Sylvain Espinasse, Michel Gohar, Josette Chaufaux, Christophe Buisson, Stephane Perchat, Vincent Sanchis (2002). "Correspondence of High Levels of Beta- Exotoxin I and the Presence of *cryIB* in *Bacillus Thuringiensis*", *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 4182-4186.
76. Tabien, R. E., Z. Li, A. H. Paterson, M. A. Marchetti, J. W. Stansel and S. R. M. Pinson (2000). *Mapping of four major rice blast resistance genes from "Lemont" and "Teging" and evaluation of their combinatorial effect for field resistance*. *Theoretical Applied Genetic*, 101:1215-1225.
77. The Life Sciences Network (2003). Vip cotton ready to launch in 2004, 2005, <http://www.lifesciencesnetwork.com/newsdetail.asp?newsID=3072>.(Syngenta)
78. Tsai, W. H. (1998). *Estimation of rice yield losses caused by leaf blast disease*, J. Taiwan AgricRes., PP. 37.
79. V. A. Doss, K. Anup Kumar, R. Jayakumar, V. Sekar (2002). "Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (Vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, (26), pp. 82-88.
80. Vaeck M, Reynaerts A, Huwffter H, Jansens S, DeBeuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Montagu MV, Leemans J (1987). *Transgenic plants protected from insect attack*. *Nature* 328:33-37
81. Van Wordragen MF, Dons HIM (1992). *A.tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Molecular Biology manual*. Rep. 10: 12-36.
82. Vance Kramer (2002). *Protocol of DNA isolation of Cosmid library*, Syngenta company, USA.
83. Wang, G-L., D. J. Mackill, J. M. Bonman, S. R. McCouch, M.C. Champoux and R. J. Nelson. (1994). *RFLP mapping of conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar*. *Genetics*, 136: 1421-1434.
84. Wiinn J, Klotti A, Burhardt PK, Ghosh Biswas GC, Launis K, Iglesias VA, potrykus I. (1996). *Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic cry1A(b)gene from Bacillus thuringiensis provides effective pest control*. *Bio/Technology* 14: 171-176.
85. Wright W, Dawson J, Dunder E, Sultie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L. (2001). *Efficient biolistic transformation of maize (Zea mays L.) and wheat (Triticum aestivum L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker*. *Plant Cell Rep*. 20: 429-436.
86. Wu G, Cul H, Ye G, Xin Y, Sardam.R, Cheng X, Li Y, Altosaar, Shu Q. (2002). Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in *Bt (Bacillus thuringiensis)* transgenic rice. *Theor Appl Genet*. 104: 727-734.
87. Ye X, Al-Babili S, Kl  ti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305
88. Zheng, K. L., Chai, R.Y., Jin, Z. M., Wu, J. L., Fan, Y. Y., Leung, H., Zhang, J. Y (1998). "Mapping of leaf and blast resistance genes with RFLP, RAPD and resistance gene analog in rice" 2nd International rice blast conference, Franch, PP.13.