

NGHIÊN CỨU TẠO CÂY KHOAI LANG KHÁNG BỌ HÀ BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN NHỜ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

TỔNG QUAN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về khoai lang

1.1.1. Nguồn gốc và vị trí phân loại

Khoai lang thuộc bộ Solanales, họ Convolvulaceae, chi *Ipomoea*, loài *Ipomoea batatas*. Khoai lang là một loài cây nông nghiệp với các rễ củ lớn, chứa nhiều tinh bột, có vị ngọt, được gọi là củ khoai lang. Khoai lang có quan hệ họ hàng xa với khoai tây (*Solanum tuberosum*) và quan hệ họ hàng rất xa với khoai mỡ (một số loài trong chi *Dioscorea*).

Nhiều nhà khoa học cho rằng khoai lang được thuần hóa từ hơn 5000 năm trước và có nguồn gốc từ Mỹ La Tinh (Hoàng Thị Sản, 2002; Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Đình Sy, 1998). Khoai lang được du nhập vào Trung Quốc cuối thế kỷ 16. Do khả năng thích ứng rộng và dễ nhân giống khoai lang đã được mở rộng ở châu Á, châu Phi, châu Mỹ La Tinh vào thế kỷ 17 và 18.

Nó cũng được biết tới trước khi sự thám hiểm của người phương tây tới Polynesia, sau đó nó phổ biến sang các nước ở Châu Âu như: Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc, Philippin, Indonesia, Việt Nam.

Khoai lang là cây lương thực quan trọng của người Mayan ở Trung Mỹ và người Peruvian ở các vùng núi Andet (Nam Mỹ). Khoai lang được khám phá bởi Christophe Columbus trong cuộc thám hiểm tìm ra châu Mỹ năm 1492. Khoai lang phổ biến rộng bằng 2 con đường (Bùi Huy Đáp, 1984):

Ø Con đường 1: Các nhà buôn Tây Ban Nha đưa khoai lang vào châu Âu. Sau đó được truyền tới châu Phi, rồi vào Ấn Độ, phía Tây Ấn (châu Á).

Ø Con đường 2: Người Tây Ban Nha mang từ Trung Mỹ tới Philippines. Sau đó, đưa tiếp tục đến Châu Phi. Khoai lang được đưa vào Trung Quốc từ Philippin và xuất hiện ở Fukien năm 1594. Con đường khác vào Trung Quốc là do người Tây Ban Nha đưa vào vùng Combatfami năm 1674. Một người Anh đưa khoai lang vào Nhật năm 1615. Khoai lang tiếp tục được đưa vào Malaysia và các nước Nam Á, Đông Nam Á. Khoai lang được nhập vào Việt Nam theo con đường từ Phúc Kiến - Trung Quốc khoảng cuối thế kỷ 16 (Bùi Huy Đáp, 1984; Đình Thế Lộc, 1995;1997).

Hiện nay, khoai lang được phát triển ở trên 100 quốc gia nhiệt đới và ôn đới ẩm. Ở Việt Nam, khoai lang được trồng rất phổ biến, trước đây chủ yếu ở các vùng đồng bằng đất bãi ven sông, hiện nay khoai lang đã được trồng nhiều ở các vùng đồi, trung du từ Bắc vào Nam.

Hình 1.1. Giống khoai lang KB1

(<http://www.fcrl.com.vn/images/c198/33>)

1.1.2. Đặc điểm sinh thái và di truyền

Khoai lang là cây hai lá mầm và là cây trồng lục bội với số bội thể $2n = 90$, là loài cây thân thảo dạng dây leo sống hằng năm, thân mềm bò hoặc leo, dài 2 - 3 m, các lá mọc so le hình tim hay xẻ thùy chân vịt, các hoa có tràng hợp và kích thước trung bình. Hoa màu tím nhạt hay trắng, mọc thành xim ít hoa ở đầu cành hay nách lá. Rễ củ ăn được có hình dáng thuôn dài và thon, lớp vỏ

nhấn nhụy có màu từ đỏ, tím, nâu hay trắng. Lóp củi thịt có màu từ trắng, vàng, cam hay tím (Hoàng Thị Sản, 2002; Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Đình Sy, 1998).

Khoai lang được trồng từ lâu đời ở nước ta, có phổ thích nghi rất rộng, nhưng tốt nhất là trồng trên đất pha cát, lượng mưa năm khoảng 1000 mm, có khả năng chịu hạn, chịu đất xấu. Khoai lang là cây giao phấn, ngày ngắn, không ra hoa khi ngày dài quá 13 giờ 30 phút, do đó ít khi ra hoa ở những vùng có vĩ độ ôn đới trên 30 độ Bắc hay Nam. Ở vùng nhiệt đới, nó dễ ra hoa, có hạt, có sức sống, nhưng thường chỉ trồng bằng các đoạn dây gọi là hom.

Khoai lang là cây trồng đặc biệt có thể trồng được ở những nơi có điều kiện canh tác khó khăn, dễ trồng, dễ chăm sóc, ít đầu tư phân bón, thuốc bảo vệ thực vật. Nhiệt độ thích hợp trong quá trình sinh trưởng phát triển của cây là từ 15-30 oC, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ trung bình khoảng 24 oC, độ ẩm thích hợp từ 60-70%. Khoai lang có khả năng chịu đất chua, nó sinh trưởng bình thường ở pH = 4,5 - 8.

Khoai lang được coi là cây trồng thân thiện với môi trường vì đầu tư thâm canh thấp đặc biệt là yếu tố nitơ, có khả năng sinh trưởng nhanh, che phủ đất, chống xói mòn, khoai lang có khả năng đặc biệt trồng được dưới tán che bóng, xen canh với cây khác. Tuy vậy, phải dựa vào các đặc điểm sinh trưởng phát triển của các giống khoai lang mà chọn giống phù hợp với từng điều kiện khí hậu, từng mùa vụ, từng vùng để đạt năng suất cao nhất.

1.1.3. Đặc điểm hình thái

Khoai lang là cây lương thực ăn củ và lấy dây lá, trồng hàng năm. Khoai lang là loài cây thân thảo dạng dây leo, có các lá mọc so le hình tim hay xẻ thùy chân vịt, các hoa có tràng hợp và kích thước trung bình, hoa trắng, vàng hay tím, hình phễu. Củ hình thoi do rễ phồng lên, chứa tinh bột và đường, vỏ củ màu trắng, vàng hay đỏ tím, thịt củ trắng, vàng hay tím nhạt tùy theo giống. Hoa khoai lang thuộc loại hoa lưỡng tính. Quả khoai lang thuộc loại quả sóc, mỗi quả có từ 1-4 hạt màu đen, vỏ dày, khó nảy mầm. Khoai lang trồng ở vùng nhiệt đới thường có thân bò, trồng ở vùng ôn đới thường có dạng bụi.

1.1.4. Giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế của cây khoai lang

Giá trị dinh dưỡng:

Khoai lang chứa nhiều loại chất dinh dưỡng và vitamin khác nhau: 8 - 29% tinh bột, 7,5% glucose; khi còn tươi củ chứa 1,0 - 2,4% protein, 1,8 - 6,4 % chất béo. Trong tro có Mn, Ca, Cu, các vitamin A, B, C, 4,24% tanin, 1,375% pentosan. Khi đã phơi ở chỗ thoáng mát, trong củ có inosit, dextrin, axit chlorogenic, phytosterol, carotin, adenin, betain, cholin. Dây khoai lang cũng có chứa adenin, betain, cholin.

Bảng 1.1. Thành phần và hàm lượng dinh dưỡng trong củ khoai lang

Hàm lượng

Phần trăm hoặc mg/100g

Protein

1,0-2,4

Chất béo

1,8-6,4

Tinh bột

8,0-29

Glucose

0,5-7,5

Đường khử

0,5-7,5

Tro

0,9-1,4

Caroten

4 mg/100 g

Thiamin(B1)

0,1 mg/100 g

Vitamin C

25 g/100 g

Riboflavin

0,06 mg/100 g

Ngoài ra, trong khoai lang tươi còn có nhiều vitamin và muối khoáng. Khi phơi khô rút gần hết nước, giá trị dinh dưỡng của cây khoai lang còn cao hơn. Trong 100g khoai lang khô có 11g nước, 2,2 g protit, 0,5 g lipit, 80g gluxit, 3,6 g xelulaza và có thể cung cấp cho cơ thể sống 342 calo (Đình Thế Lộc, 1995;1997; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Khoai lang ngày càng được thế giới quan tâm và được coi là cây trồng đảm bảo an ninh lương thực vì có hàm lượng vitamin và dinh dưỡng cao. Hiện nay ở châu Phi, khoai lang đang được sử dụng như một vũ khí hữu hiệu để chống lại nạn thiếu vitamin A và C đang lan rộng. Theo CIP

(June, 2000), nạn thiếu vitamin A ở châu Phi đã gây mù lòa và thậm chí cướp đi sinh mạng của 250.000 - 500.000 trẻ em mỗi năm.

Trên 90% sản phẩm khoai lang được sản xuất ở các nước đang phát triển. Khoảng gần một nửa sản phẩm khoai lang ở châu Á được sử dụng làm thức ăn gia súc, phần còn lại được sử dụng làm lương thực cho người và chế biến. Ở những nước đông dân cư vùng nửa đồng bằng của Tây Phi cây khoai lang được ví là "người bảo hộ của trẻ em". Lịch sử đã chứng minh khoai lang là cây trồng cứu đói vào những thời kỳ khủng hoảng của thế giới như thời kỳ sau Thế chiến thứ 2, sau trận động đất tàn phá năm 1990 ở Bắc Luzon, bạo loạn nội chiến tại Rwanda vài năm gần đây... Ngày nay, khoai lang ngày càng trở nên quan trọng do nhu cầu tiêu thụ tinh bột khoai lang ở thị trường châu Á tăng cao.

Giá trị kinh tế:

Các giống khoai lang giàu tinh bột được sử dụng theo các hướng sau đây

- Làm nguyên liệu để chế biến các sản phẩm công nghiệp: Tinh bột khoai lang có thể chế biến sâu thành các sản phẩm tinh bột biến tính, các sản phẩm hoá công, các sản phẩm lên men thủy phân, được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp thực phẩm, dệt, giấy, vật liệu xây dựng, cao su nhân tạo...

- Làm nguyên liệu lý tưởng để sản xuất thức ăn chăn nuôi có giá cạnh tranh cao. Với công nghệ mới, khoai lang khô thông qua công nghệ vi sinh để chế biến thức ăn vi sinh giàu đạm, có hàm lượng protit cao tới trên 40%, tương đương hàm lượng đạm trong đậu tương. Nguyên liệu giàu đạm hiện nay chủ yếu dựa vào đậu tương và bột cá nhập khẩu. Nếu sử dụng thức ăn vi sinh giàu đạm từ khoai lang để phối chế với các nguyên liệu chất bột khác thì sẽ giảm hẳn nhu cầu nhập khẩu đậu tương và bột cá đắt tiền, là những mặt hàng mà Việt Nam không có lợi thế phát triển như Mỹ, Braxin, Achen-tin và Peru (Nguyễn Công Tạn, 2012).

- Làm nguyên liệu để sản xuất ethanol sinh học có giá cạnh tranh, thân thiện với môi trường, góp phần phát triển năng lượng tái tạo thay thế năng lượng hóa thạch. Cây khoai lang được coi là cây vua năng lượng. Hiệu suất sản xuất ethanol sinh học từ khoai lang cao hơn hẳn mía đường, cao lương, ngô, sắn và khoai tây. Với năng suất khoai lang có tinh bột đạt 70 tấn/ha/vụ thì 1 vụ khoai có thể sản xuất 10 tấn ethanol/ha, nếu 1 năm làm 2 - 3 vụ có thể sản xuất 20 tấn- 30 tấn ethanol/ha năm, tạo ra triển vọng phát triển ethanol sinh học có giá cạnh tranh, không tranh chấp lương thực của loài người. Với công nghệ sản xuất ethanol sinh học từ khoai lang, thông qua chu trình tuần hoàn khép kín, không thải ra độc tố, lại còn sản sinh khí CH₄ để phát điện, đem lại lợi ích to lớn về kinh tế gắn với bảo vệ môi trường (Bùi Huy Đáp, 1984; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Với các công năng như trên, khoai lang đang là một sản phẩm có thị trường tiêu thụ khá rộng lớn. Không chỉ trong nước mà còn xuất khẩu đi nhiều nước trên thế giới. Khoai lang là một cây trồng hứa hẹn mang lại hiệu quả kinh tế cao. Khoai lang đầu tư ít, bán được giá, lợi nhuận đem lại cho nông dân chắc chắn cao hơn hẳn những cây trồng ngắn ngày khác ở nước ta.

1.1.5. Tình hình sản xuất khoai lang trên thế giới và Việt Nam

Bảng 1.2. Diện tích, năng suất, sản lượng khoai lang năm 2012 (<http://gso.gov.vn/default.aspx?tabid=717>)

Chỉ tiêu
Khu vực

Diện tích (ha)

Năng suất (hg/ha)

Sản lượng (tấn)

Thế giới

8 087 116

127543

103 145 500

Châu Phi

3 506 508

51332

17 999 686

Châu Mỹ

264 230

122786

3 244 382

Châu Á

4 177 239

194139

81 096 554

Châu Âu

4054

126687

51359

Châu Đại Dương

135 084

55782

753 520

Hg/ha: hectogam/ha (1hg = 0,1kg = 0,001 tạ)

Khoai lang là cây lương thực có địa bàn phân bố rộng, thích ứng với các điều kiện nhiều vùng sinh thái khác nhau, phân bố rộng rãi ở nhiều châu lục trên thế giới, đặc biệt là các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới.

Hiện nay khoai lang đã được trồng ở trên 100 quốc gia trên thế giới như ở châu Á (31 nước), châu Phi (39 nước) và châu Mỹ La Tinh (31 nước). Theo thống kê của FAO (2012), tổng sản lượng thu hoạch khoai lang tập trung chủ yếu ở châu Á với xấp xỉ 81,1 triệu tấn/ năm, trong đó Trung Quốc là nước có tổng sản lượng cao nhất thế giới với 73,14 triệu tấn và năng suất 21 tấn/ha. Trong khi ở châu Phi sản lượng là 17,99 triệu tấn với năng suất trung bình tuwogn đối thấp là 5,1 tấn/ha, châu Mỹ có sản lượng là 3,2 triệu tấn và năng suất là 12,28 tấn/ha. Diện tích canh tác khoai lang không ngừng tăng trong những năm vừa qua.

Bảng 1.3. Diện tích và sản lượng khoai lang của 4 vùng sinh thái và cả nước
(<http://www.fcrl.com.vn/images/c198/33>)

Chỉ tiêu

Vùng

Năm 2009

Năm 2010

Năm 2011

Diện tích (ha)

Sản lượng
(nghìn tấn)

Diện tích
(ha)

Sản lượng
(nghìn tấn)

Diện tích
(ha)

Sản lượng (nghìn tấn)

Cả nước

146,6

1.211,3

150,8

1.318,5

148,5

1.390,6

Đồng bằng sông Hồng

22,8

195,1

27,0

247,0

26,1

241,9

Trung du và miền núi phía Bắc

38,1

239,1

38,9

256,3

37,7

251,0

Bắc Trung Bộ và Duyên hải miền Trung

55,4

330,7

53,9

340,6

49,6

313,8

Đồng bằng sông Cửu Long

14,2

279,4

14,9

307,1

Ở nước ta, khoai lang chiếm một vị trí quan trọng trong sản xuất lương thực, đứng thứ 3 sau lúa và ngô. Khoai lang là cây lương thực dễ trồng, đầu tư thấp nhưng có tiềm năng, năng suất cao. Từ lâu, nhân dân ta đã có truyền thống sử dụng khoai lang làm lương thực thực phẩm và thức ăn gia súc (tươi hoặc phơi khô), ngọn và lá sử dụng làm rau xanh. Hiện nay, do lượng khoai lang làm lương thực cho người giảm, ngành chăn nuôi ngày càng phát triển, nên ngoài những giống khoai lang có năng suất củ cao, các giống thuộc nhóm có năng suất thân lá cao đang được người sản xuất quan tâm. Những giống có hàm lượng đường, hàm lượng protein cao làm nguyên liệu cho chế biến (bánh kẹo, chips khoai lang,...) cũng đang được chú ý.

Những năm gần đây, do việc chuyển đổi cơ cấu cây trồng nên diện tích khoai lang ở nhiều vùng bị thu hẹp lại. Tuy nhiên, ở những vùng đất nghèo dinh dưỡng, không chủ động tưới nước, cây khoai lang vẫn chiếm một diện tích khá lớn. Ở những vùng sản xuất lúa khó khăn, vùng đất bạc màu, đất cát ven biển khoai lang đã chiếm vị trí ngang hoặc cao hơn sản xuất lúa, đặc biệt khoai lang là cây trồng hiệu quả nhất khi mùa màng bị thiệt hại do thiên tai, bão lụt vì nó góp phần đảm bảo an ninh lương thực (Bùi Huy Đáp, 1984; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Riêng đối với vùng Bắc Trung Bộ, khoai lang là cây trồng chính trên đất cát ven biển và là cây trồng không thể thiếu trong cơ cấu cây trồng của vùng đất bãi, đất phù sa bồi đắp, ở những vùng ven biển khoai lang còn là cây có tác dụng khai hoang và làm thức ăn gia súc quan trọng. Trước đây có những năm diện tích khoai lang cả nước đã đạt tới 450.000 ha.

Diện tích khoai lang của Việt Nam dự kiến ổn định khoảng 188,4 nghìn ha nhưng sẽ tăng năng suất và sản lượng khoai lang bằng cách chọn tạo và phát triển các giống khoai lang tốt có năng suất củ tươi và hàm lượng tinh bột cao, xây dựng và hoàn thiện quy trình kỹ thuật canh tác khoai lang bền vững và thích hợp vùng sinh thái, đảm bảo thu nhập cho người dân, nhất là các hộ nghèo, các hộ vùng sâu vùng xa.

1.1.6. Nguồn gen giống khoai lang Việt Nam

Hầu hết những nước trồng nhiều khoai lang trên thế giới đều có bộ sưu tập nguồn gen giống khoai lang. Nơi lưu giữ nguồn gen khoai lang lớn nhất toàn cầu là Trung tâm Khoai tây Quốc tế (Centro Internacional de la Papa - CIP) với tổng số 7007 mẫu giống khoai lang được duy trì năm 2005. Trong số này có 5920 mẫu giống khoai lang trồng (*Ipomoea batatas*) và 1087 mẫu giống khoai lang loài hoang dại (*Ipomoea trifida* và các loài *Ipomoea* khác). Việc duy trì nguồn gen ở CIP được thực hiện trong ống nghiệm, trên đồng ruộng, bảo quản bằng hạt và được đánh giá theo tiêu chuẩn quốc tế.

Nguồn gen giống khoai lang Việt Nam chủ yếu được thu thập, đánh giá và bảo tồn tại Trung tâm Tài nguyên Thực vật, thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam với 528 mẫu giống đã được tư liệu hoá (trong đó có 344 mẫu do Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc chuyển đến), Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (FCRI) có 118 mẫu giống, Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc hiện có 78 mẫu giống, Trường Đại Học

Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh có 30 mẫu giống.

Từ 1999 - 2006, Trung tâm Khoai tây Quốc tế tại Hà Nội (CIP-Hanoi) và CIP Peru hợp tác hỗ trợ về kinh phí và vật liệu giống phục vụ cho công tác nghiên cứu, chọn tạo giống và phát triển cây khoai lang tại Việt nam, các cơ quan nghiên cứu như Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam (VASI cũ, nay là VAAS), Viện Cây lương thực - Cây thực phẩm (FCRI) và Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội đã chọn tạo ra nhiều giống có triển vọng theo các hướng sử dụng: Lai tạo theo hướng hàm lượng chất khô cao; Chọn tạo giống theo hướng năng suất thân lá và năng suất củ cao.

Bảng 1.4. Hiện trạng nguồn gen khoai lang tại Việt Nam năm 2009 (Hoàng Kim, 2011)

Cơ quan, địa điểm

Năm

Số mẫu ban đầu

Số mẫu bảo tồn

VASI (Hà Nội)

1993-2004

-

528

FCRI (Hải Dương)

2004

-

118

1993

HARC (Đồng Nai)

1993

344

78

1993-2006

12.071 hạt lai

Các nhà chọn tạo giống đã chọn ra nhiều giống mới có triển vọng như: K1 (Số 59), K2 (Số 8), K4 (V15-70), K51, KL5, KL1, KB1, VX-37, HL4, TV1, H12, giống khoai lang cực nhanh, giống khoai lang 143. Hai giống khoai lang TV1 và H12 là 2 giống mới do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam chọn lọc có năng suất và chất lượng ăn tươi cao đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận giống tạm thời năm 2004. Mặc dù vậy, việc sử dụng giống vào trong sản xuất chưa nhiều, kỹ thuật thâm canh còn một số khâu vẫn cần phải hoàn thiện để đảm bảo cho 2 giống phát triển bền vững trong vụ Đông và vụ Hè Thu của các vùng ven đô, Trung du và Duyên hải Bắc Trung Bộ.

Ở các tỉnh phía Nam, các giống khoai lang hiện trồng phổ biến là HL518 (Nhật đỏ), HL491 (Nhật tím), Murasa kimasari (Nhật tím), Kokey 14 (Nhật vàng), HL497 (Nhật cam), HL4, Hoàng Long, Chiêm Dâu, Trùi Sa, Bí Đ à Lạt, Dương Ngọc, Tàu Nghẹn, Trùi Sa (Cần Sa), Khoai Sữa, Khoai Gạo.

Những năm gần đây, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh cũng đánh giá và tuyển chọn 24 giống khoai lang khảo nghiệm toàn cầu trong chương trình hợp tác với CIP và khảo sát các giống khoai lang nhiều dây lá, năng suất bột cao cho hướng chế biến cồn trong chương trình hợp tác với công ty Technova và công ty Toyota Nhật Bản (Hoàng Kim, 2008).

Những giống khoai lang phẩm chất ngon đang được đánh giá và tuyển chọn trong đề tài “Thu thập, khảo sát, so sánh và phục tráng giống khoai lang tại huyện Xuân Lộc tỉnh Đồng Nai 2008-2010”. Đây là nội dung hợp tác giữa Sở Khoa học Công nghệ Đồng Nai, Viện Sinh học Nhiệt đới, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh và Phòng Nông nghiệp Xuân Lộc. Kết quả bước đầu có HL518, HL491, Kokey 14, HL284, HL536 (CIP 083-14), HL574 (Cao sản), HL585, HL597.

Kết quả nghiên cứu khác liên quan đến việc đánh giá các tập đoàn giống khoai lang do Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Bắc Trung Bộ chủ trì đã lập được danh sách 3 tập đoàn giống khoai lang thuộc: (1.) Nhóm các giống năng suất cao; (2.) Nhóm các giống chất lượng cao và (3.) Nhóm giống chuyên làm rau xanh. Đây là tiền đề tốt để chúng tôi phối hợp lựa chọn giống trong nhóm giống năng suất và nhóm giống chất lượng cao những đối tượng thích hợp của bộ hà để nghiên cứu chuyển gen kháng bộ hà.

Khái quát về giống khoai lang KB1: Giống khoai lang KB1 được chọn lọc từ tổ hợp lai tự nhiên của giống mẹ Regal có nguồn gốc từ Mỹ từ năm 1993 tại Viện Cây lương thực. Giống được công nhận là giống quốc gia theo Quyết định số 5310 QĐ/BNN-KHCN ngày 29 tháng 11 năm 2002.

Giống KB1 có đặc điểm chính sau:

- Giống khoai lang KB1 có dạng thân nửa đứng lá hình tim màu xanh nhạt, lá non màu tím.
- Giống khoai lang KB1 có củ to và khá đồng đều, màu vỏ vàng nhạt, màu ruột củ trắng ngà.
- Năng suất củ có thể đạt 15 - 30 tấn/ ha, cao hơn Hoàng long từ 20 - 40%. Chất lượng củ của giống khoai lang KB1 tương đương Hoàng long.

A

B

C

D

Hình 1.2. Một số giống khoai lang Việt Nam:

A) KB1; B) Chiêm Dâu; C) KL5; D) K51

Hình 1.3. Hình thái củ giống khoai lang KB1 và Hoàng Long
(<http://www.fcrl.com.vn/images/c198/33>)

1.2. Phương pháp nuôi cấy mô - tế bào thực vật

Trong mấy thập kỉ qua nuôi cấy mô tế bào thực vật đã phát triển mạnh mẽ ở nhiều quốc gia trên thế giới (cả ở các nước phát triển và đang phát triển). Đây là công cụ cần thiết trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của ngành sinh học

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào thực vật (totipotency)

Năm 1838, Schleiden và Schwann đưa ra học thuyết tế bào. Hai khía cạnh quan trọng của học thuyết tế bào: 1) Ngoài tính đa dạng cao của cơ thể sống, mọi sinh vật đều gồm tế bào và 2) mọi tế bào đều tương tự về cấu trúc và chức năng.

Năm 1902, Haberlandt - nhà thực vật học người Đức là người đề xướng học thuyết về tính toàn năng của tế bào.

Tính toàn năng của thực vật: Mỗi tế bào của bất kỳ cơ thể sinh vật nào đều mang toàn bộ thông tin di truyền của cơ thể đó và có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi

Tính toàn năng của TBTV: là khả năng của của tế bào đã biệt hoá (trừ một số tế bào đã biệt hoá sâu như ống mạch, mao dẫn) có khả năng thể hiện toàn bộ thông tin di truyền và có thể phát triển thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện thuận lợi giống như chu trình phát triển của phôi.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật in vitro đã hình thành từ vài thập kỷ trước mà cơ sở của nó là giả thuyết của nhà thực vật học người Đức Haberland (1902): Tất cả các tế bào của thực vật đều có tính toàn năng (totipotency), nghĩa là mỗi tế bào đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền của cơ thể. Theo Haberland mỗi tế bào thực vật đều có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi. Ông chính là người đầu tiên đề xuất phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật để chứng minh tính toàn năng của tế bào. Ông đã tiến hành thí nghiệm với các tế bào mô mềm, tế bào biểu bì, tiếc rằng đã thất bại do chúng không thể phân chia được.

Năm 1922, Kotte và Robbins lặp lại các thí nghiệm của Haberland và đã thành công nuôi được đỉnh sinh trưởng tách từ đầu rễ của cây ngô, đậu Hà lan tạo ra hệ rễ nhỏ có cả rễ phụ trong 12 ngày trên môi trường lỏng có chứa đường glucosơ, muối khoáng. Ông đã chứng minh hiệu quả của dịch chiết nấm men cho sinh trưởng và sự cần thiết của các vitamin.

1.2.2. Các giai đoạn phát triển của phương pháp nuôi cấy mô tế bào

a) Pha phát triển sinh lí

Năm 1934, White nuôi cấy thành công đầu rễ cà chua trong một thời gian dài trên môi trường lỏng có chứa muối khoáng, đường glucose và nước chiết nấm men. Gautheret đã thành công trong nuôi cấy mô tượng tầng và tìm được môi trường thích hợp.

- Khám phá ra vai trò thúc đẩy của hàng loạt các vitamin nhóm B (B1- Thiamin HCl; B6- Pirydoxin HCl, axit nicotinic – B3).

- Went và Thimann tìm ra được chất KTST đầu tiên là IAA. Sau đó, Miller và Skoog trong khi nuôi cấy mô lõi cây thuốc lá đã xác định được vai trò của kinetin trong sự kích thích phát triển mô.

- 1939, Gautheret và Nobercourt đã duy trì được sinh trưởng của mô sẹo cà rốt trong một thời gian dài. Năm 1941, Van Overbeck đã chứng minh tác dụng tốt của nước dừa trong nuôi cấy cây họ cà. Năm 1952, Steward và Milles xác định tầm quan trọng của nước dừa trong nuôi cấy mô

seo và phát sinh phôi ở cà rốt. Cũng trong khoảng thời gian này (1950), nhiều chất KTST nhóm auxin được nghiên cứu và tổng hợp thành công: 2,4D, NAA. Năm 1954, Skoog đã phát hiện ra kinetin- có trong chế phẩm thủy phân tinh dịch cá có tác dụng kích thích sự phân bào.

Việc phát hiện ra các chất KTST cùng với các loại vitamin và nước dừa là những bước tiến có ý nghĩa trong giai đoạn 2 của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Năm 1957, Skoog và Miller đã chứng minh sự biệt hoá của rễ, chồi trong nuôi cấy mô tủy cây thuốc lá phụ thuộc vào nồng độ tương đối của auxin/cytokinin. Thành công này có ý nghĩa vô cùng quan trọng dẫn đến nhiều phát hiện quan trọng là tiền đề cho giai đoạn phát triển tiếp theo của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Trong giai đoạn mới từ năm 1960 trở lại đây, cùng với việc nuôi cấy mô tế bào đơn, tế bào trần (protoplast), kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, hạt phấn được phát triển mạnh

- 1960, Morel đã nuôi cấy đỉnh sinh trưởng phong lan và tạo được các protocorm, và các protocorm này trong các điều kiện nhất định có thể phát triển thành cây lan hoàn chỉnh và sạch bệnh.

- 1960, Cocking đã thu được các tế bào trần dùng cho nuôi cấy mô tế bào thực vật xử lý bằng enzyme xelulaza

- 1966, Guha và cs đã tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn cây cà độc dược (*Datura innoxia*). 1967, Borgin và Nitsch cũng đã thành công ở cây thuốc lá

Việc tạo cây đơn bội thành công ở nhiều loài thực vật thông qua nuôi cấy bao phấn và hạt phấn đã đóng góp rất lớn cho nghiên cứu di truyền và lai tạo giống.

Từ 1970 trở đi, các nhà khoa học đã rất chú ý vào triển vọng của kỹ thuật nuôi cấy protoplast khi Takebe và cs (1971) tạo được cây hoàn chỉnh đầu tiên từ protoplast.

b) Giai đoạn phát triển di truyền

Melcher và cs đã lai tạo thành công protoplast của cà chua và protoplast khoai tây, mở ra một triển vọng mới trong lai xa ở thực vật.

Ngoài ra, trong những điều kiện nhất định, protoplast có khả năng hấp thu các phân tử lớn, các cơ quan tử từ bên ngoài, do đó chúng là đối tượng lý tưởng cho các nghiên cứu di truyền thực vật.

c) Giai đoạn phát triển chuyển gen

Năm 1985, Horsch và cs đã chuyển gen vào thực vật bằng *Agrobacterium tumefaciens* và tạo cây chuyển gen đầu tiên. Năm 1986, lần đầu tiên tại Pháp và Mỹ cây thuốc lá chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ đứ ra trồng thử nghiệm trên đồng ruộng. Diện tích cây trồng chuyển gen không ngừng tăng lên trên toàn cầu. Năm 1996, diện tích cây trồng chuyển gen trên toàn cầu mới chỉ là 1,7 triệu ha, đến năm 1997 con số này đã là 11 triệu ha. Năm 2001 con số này đã lên đến 44 triệu ha và năm 2004 diện tích cây trồng chuyển gen toàn cầu đã lên đến 81 triệu ha. Đến năm 2010, con số này đã lên đến 148 triệu ha (James, 2010)

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy mô tế bào thực vật

1.2.3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Nghiên cứu về môi trường nuôi cấy giữ một vị trí quan trọng trong lịch sử phát triển của nuôi cấy mô – tế bào. Cơ sở cho việc xây dựng các môi trường nuôi cấy là việc xem xét các thành phần cần cho sự sinh trưởng và phát triển của cây. Đã có rất nhiều loại môi trường được nghiên cứu phù hợp cho việc nuôi cấy từng loài, từng bộ phận và tùy theo mục đích nuôi cấy. Cho đến nay có hàng trăm loại môi trường dinh dưỡng đã được xây dựng và thử nghiệm có kết quả. Hầu hết các loại môi trường đều bao gồm những thành phần chính sau:

Thành phần khoáng

Các nguyên tố khoáng dùng trong môi trường dinh dưỡng nuôi cấy mô – tế bào thực vật được chia thành hai nhóm theo hàm lượng sử dụng: nhóm đa lượng và nhóm vi lượng.

- Nhóm đa lượng: gồm các nguyên tố như Nitơ, lưu huỳnh, photpho, magiê, canxi. Chúng đặc biệt cần thiết đối với quá trình sinh trưởng và trao đổi chất của tế bào.
- Nhóm vi lượng gồm các nguyên tố như sắt, mangan, bo, molybden... là nhóm nguyên tố được sử dụng với nồng độ rất nhỏ nhưng lại không thể thiếu đối với sự phát triển của mô – tế bào (Lê Trần Bình et al., 1997).

Nguồn cacbon

Phần lớn mô và tế bào thực vật nuôi cấy in vitro sống theo phương thức dị dưỡng vì vậy việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn cacbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn cacbon thông dụng hiện nay là sucrose. Nồng độ thích hợp là 2-3% song cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi cấy mà thay đổi. Ngoài ra còn có thể sử dụng một số nguồn cacbon khác như glucose, maltose, fructose... Các loại rượu như glycerin cũng được tế bào sử dụng. Manitol hoặc sorbitol còn có thể được sử dụng trong nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy protoplast với chức năng là chất ổn định áp suất thẩm thấu (Lê Trần Bình et al., 1997).

Vitamin

Mặc dù tất cả các loại mô và tế bào thực vật nuôi cấy in vitro có khả năng tự tổng hợp được hầu hết các loại vitamin, nhưng thường không đủ về lượng, do đó phải bổ sung thêm từ bên ngoài vào, đặc biệt là các vitamin thuộc nhóm B như: B1, B3, B5, B6, meso-inosit... rất cần thiết cho các phản ứng sinh hóa

Ø Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Trong môi trường nuôi cấy mô – tế bào thực vật thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy là các chất điều khiển sinh trưởng, thuộc các nhóm sau:

- Auxin (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000)

Có 4 loại auxin thường được sử dụng là: Indole acetic acid (IAA), Naphthylacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid (2,4-D), Indol butyric acid (IBA). Chúng chủ yếu có tác dụng kích thích sinh trưởng của tế bào nhưng cũng làm phân bào.

- Cytokinin

Là nhóm các phytohormone dẫn xuất của adenin. Cytokinin liên quan chặt chẽ với phân bào, duy trì sự trẻ hóa của các cơ quan, làm giảm hiện tượng ưu thế ngọn, kích thích sự phân hóa chồi từ mô sẹo nuôi cấy. Các loại cytokinin thường dùng trong môi trường nuôi cấy là kinetin, 6-Benzylaminopurin (BAP). Ngoài ra còn có Zeatin nhưng nó ít được sử dụng trong nuôi cấy vì giá thành quá đắt (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000).

- Gibberellic acid

Tới nay đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid. Loại thông dụng nhất trong nuôi cấy mô là GA3. Trong cơ thể thực vật, gibberellin đóng vai trò quan trọng đối với nhiều quá

trình sinh lý như: Sinh lý ngủ nghỉ của hạt và chồi, phát triển của hoa, làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật.

- Abscisic acid

Abscisic acid (ABA) thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng. ABA có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi, vì vậy ABA được đưa vào môi trường tái sinh cây và mang lại hiệu quả nhất định (Đương Tấn Nhựt, 2011; Vũ Văn Vụ, 2001).

Các hỗn hợp chất tự nhiên

Sự bổ sung thêm một số các hỗn hợp dinh dưỡng tự nhiên như: nước dừa, dịch chiết mầm lúa mì, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein... vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của mô nuôi cấy.

Chất độn- thạch (Agar)

Agar là thành phần quyết định trạng thái vật lý của môi trường. Hàm lượng agar dùng trong nuôi cấy dao động 0,6 – 1,0 % theo khối lượng. Tuy nhiên còn tùy thuộc vào từng đối tượng nuôi cấy mà sử dụng cho phù hợp (Lê Trần Bình et al., 1997; Lê Trần Bình, Quyền Đình Thi, 2009).

Nước

Nước là thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy. Nước pha môi trường nuôi cấy thường là loại nước cất 2 lần (Lê Trần Bình, Quyền Đình Thi, 2009).

Độ pH của môi trường

Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Độ pH môi trường thường được điều chỉnh từ 5,5 – 6,0 trước khi khử trùng. Nhìn chung nếu độ pH cao hơn 6,0 sẽ làm môi trường bị cứng và nếu thấp hơn 5,0 thì agar khó đông (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000; Vũ Văn Vụ, 2001).

1.2.3.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ

Yêu cầu về nhiệt độ cho sinh trưởng và phát triển ở các loài là không như nhau. Tuy nhiên trong thực tế phòng thí nghiệm nhiệt độ thường được duy trì trong khoảng từ 25 – 28°C (Vũ Văn Vụ, 2001).

Ánh sáng

Ánh sáng có ảnh hưởng mạnh tới quá trình phát sinh hình thái của mô nuôi cấy, bao gồm cường độ, chu kỳ và thành phần quang phổ ánh sáng. Cường độ ánh sáng được dùng phổ biến cho nuôi cấy nhiều loại mô là từ 1000-2500 lux. Với cường độ ánh sáng lớn hơn thì sinh trưởng của chồi

chậm lại nhưng sẽ thúc đẩy quá trình tạo rễ. Sự thu nhận ánh sáng của chồi in vitro phụ thuộc vào bước sóng ánh sáng và chất lượng bình nuôi cấy (Vũ Văn Vụ, 2001).

1.3. Phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

Chuyển gen bằng thông qua *Agrobacterium* là phương pháp chuyển gen gián tiếp hữu hiệu đầu tiên dùng để chuyển gen ở thực vật. Phương pháp này dùng Ti - plasmid của *Agrobacterium tumefaciens* làm vectơ đưa ADN vào tế bào. Đây là phương pháp chuyển gen tỏ ra có hiệu quả hơn hẳn các phương pháp chuyển gen trực tiếp và gián tiếp khác do dễ sử dụng, ít tốn kém, hiệu quả chuyển gen cao mà số lượng bản copy đi vào hệ gen ít, thường chỉ có một bản sao tạo thuận lợi cho việc phân tích cây chuyển gen và không gây tổn thương tế bào (Anwar et al., 2011; Trần Quốc Dung et al., 2006).

Mặc dù hệ thống chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* là có hiệu quả đối với một số loài nhưng không phải tất cả thực vật có thể được biến nạp bằng con đường này. Đặc biệt, lớp một lá mầm bao gồm các cây ngũ cốc chính trên thế giới như lúa, lúa mì và ngô là không được biến nạp dễ dàng nhờ *A. tumefaciens*. Phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium* thường được dùng cho các loại cây hai lá mầm vì *Agrobacterium* mẫn cảm với những loại cây này (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

1.3.1. Cơ sở khoa học của phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*

Chủng *A. tumefaciens* được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật. Theo cơ chế tự nhiên, loài này có khả năng xâm nhiễm qua vết thương của hầu hết các loài thực vật hai lá mầm và một số ít các loài thực vật một lá mầm, kết quả là gây ra những khối u hay hình thành lông tơ ở rễ. Về sau, người ta xác định được rằng trong tế bào của các dạng hoang dại *A. tumefaciens* có chứa một loại plasmid đặc biệt gọi là Ti - plasmid (Tumor - inducing plasmid) chứa một đoạn DNA (Transferred - DNA) có thể chuyển sang tế bào chủ theo cơ chế tự nhiên. Do đó, *Agrobacterium* là một hệ thống chuyển gen tự nhiên (Lê Trần Bình 2008; Trần Quốc Dung et al., 2006).

Các Ti plasmid của *Agrobacterium* là các phân tử ADN sợi kép, mạch vòng có kích thước khoảng 200 kb gồm bốn vùng A, B, C, D. Vùng A hay còn gọi là T- ADN (transferred ADN) có kích thước từ 10 kb đến 20 kb, luôn được chuyển sang tế bào thực vật. Nó có chứa hai hệ gen: (1) Hệ gen gây khối u onc (oncogenic), nó chứa ít nhất ba gen chịu trách nhiệm tổng hợp các phytohormon là auxin (*IaaM*, *IaaH*) và cytokinin (*iptz*), cảm ứng sự phân chia tế bào liên tục tạo mô sẹo (khối u) của các tế bào bị nhiễm cũng như ảnh hưởng sang các tế bào lân cận; (2) Hệ gen mã hoá cho các enzyme điều khiển sự sinh tổng hợp các axit amin gọi là opine. Hai loại enzyme được nghiên cứu kỹ nhất là octopine synthase và nopaline synthase (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

Vùng D là vùng độc (virulence region) chứa các gen vir, giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển T - ADN vào hệ gen của tế bào thực vật. Nó lớn khoảng 40 kb và bao gồm 6 operon (vir A, vir B, vir C, vir D, vir E, vir G). Các gen vir trong *Agrobacterium* được khởi động nhờ các chất hoá học do các tế bào thực vật bị thương tiết ra. Hoạt động của vùng vir đóng vai trò lớn trong việc chuyển T- ADN sang tế bào thực vật. Sau sự hoạt hoá các gen vir, nhân tố T-ADN sẽ được cắt khỏi plasmid.

LB và RB là các yếu tố cần thiết định hướng cho sự chuyển ADN và liên quan đến sự cắt T- ADN khỏi plasmid. Các nghiên cứu cho thấy khi cắt bỏ 25 bp bên trái vùng lặp lại thì ít ảnh hưởng đến khả năng gây u nhưng khi cắt bỏ vùng bên thì sự hình thành khối u bị ảnh hưởng. Khi đoạn cắt hạn chế chứa vùng biên phải hoặc đoạn 25 bp lặp lại được gắn lại vào vùng biên phải thì sự hình

thành khối u được khôi phục. Ngoài ra nếu đoạn 25 bp được gắn ngược so với chiều tự nhiên của Ti plasmid thì hiệu quả chuyển nạp bị giảm đi rất nhiều. Các kết quả này cho thấy T-ADN được chuyển theo chiều từ phải sang trái và được xác định bởi chiều dài của vùng lặp lại.

Để chuyển nạp các gen ngoại lai vào tế bào thực vật bằng *Agrobacterium tumefaciens* cần phải có hệ thống các vectơ hữu hiệu. Hiện có hai hệ thống vectơ được phát triển đó là hệ thống vectơ liên hợp (co-integration) và hệ thống vectơ nhị thể (binary). Về nguyên tắc người ta loại bỏ vùng T-ADN gây khối u và thay thế vào đó là các gen trội chỉ thị chọn lọc - thường là các gen kháng kháng sinh hoặc các gen kháng chất diệt cỏ, cuối cùng là gắn đoạn gen cần biến nạp cùng với đoạn điều khiển phù hợp (promoter). Những phát hiện này có ý nghĩa rất quan trọng cho sự ra đời của phương pháp chuyển gen vào thực vật nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* (Nguyễn Đức Thành, 2003; Ziemienowicz, 2001).

Hình 1.4. Phương pháp chuyển gen thông qua *A. Tumefaciens*

1.3.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen nhờ *Agrobacterium*

Hệ thống nuôi cấy

Xây dựng một hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây hoàn chỉnh là tiền đề quan trọng cho thí nghiệm chuyển gen. Đối với mỗi loài thực vật, nhất thiết phải nghiên cứu tối ưu kỹ thuật nuôi cấy thích hợp. Sau đây là những hệ thống nuôi cấy đã được sử dụng (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000) :

Nuôi cấy mô sẹo: Mô sẹo là khối các tế bào mô mềm có mức độ cấu trúc di truyền thấp, chưa phân hóa, phân chia một cách hỗn loạn và có tính biến động di truyền cao. Mô sẹo thu được bằng nuôi cấy in vitro từ các phần non của các cơ quan của thực vật như thân, rễ, lá, hoa. trong môi trường chứa chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Mô sẹo có thể được duy trì liên tục trên môi trường nuôi cấy bằng cách cấy chuyển định kì.

Nuôi cấy tế bào huyền phù: Nuôi cấy tế bào huyền phù là kĩ thuật nuôi cấy tế bào đơn hoặc cụm nhỏ tế bào trong môi trường lỏng. Các tế bào này cũng được tạo ra từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân, rễ, lá, hoa, phôi... Tuy nhiên trở ngại lớn nhất của phương pháp này cần thời gian nuôi cấy dài và ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng tái sinh cây.

Nuôi cấy tế bào trần: Tế bào thực vật bị phá bỏ toàn bộ lớp vỏ bao bọc chỉ còn lại khối nguyên sinh chất được bao bọc bởi màng nguyên sinh được gọi là tế bào trần. Các tế bào trần sau khi được nuôi cấy trên môi trường thích hợp thì tái tạo thành tế bào, phát triển thành khối mô sẹo và hình thành cây hoàn chỉnh. Ứng dụng có ý nghĩa nhất ở phương pháp này là tạo cây soma, tạo cây lai tế bào chất thông qua dung hợp protoplast và ứng dụng để biến nạp gen.

Các yếu tố ảnh hưởng khác

Phổ vật chủ của *Agrobacterium* đã được xác định là rất rộng song hiệu quả biến nạp gen lại không giống nhau ở các cây chủ khác nhau. Ở cây hai lá mầm có tần suất chuyển nạp gen cao hơn nhiều so với cây một lá mầm (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

Hiệu quả biến nạp gen thông qua *Agrobacterium* ở thực vật phụ thuộc vào một số yếu tố như tiền xử lý mô thực vật, nguồn vật liệu gây nhiễm, nồng độ vi khuẩn, thời gian nuôi nhiễm và đặc biệt là khả năng tái sinh của thực vật sau biến nạp. Vì vậy, trong thí nghiệm chuyển gen, việc đầu tiên là tìm vật liệu thích hợp và nghiên cứu xây dựng hệ thống nuôi cấy tối ưu để nâng cao hệ số tái sinh cây lên cao nhất.

Qua nghiên cứu xây dựng hệ thống nuôi cấy tối ưu và tìm nguyên liệu thích hợp Prakash và

Varadarajan đã phát hiện mô sẹo từ mảnh lá và cuống lá là vật liệu phù hợp nhất để chuyển gen thông qua *Agrobacterium* so với các loại mô khác như thân, đỉnh sinh trưởng, đầu rễ (Prakash, Varadarajan, 1992).

1.4. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô và chuyển gen ở khoai lang

1.4.1. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô và tái sinh cây khoai lang

Nhiều nghiên cứu cho thấy khoai lang là một trong những đối tượng rất khó xây dựng hệ thống tái sinh cây in vitro và chuyển gen. Trong nhiều năm qua đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới tập trung vào việc tìm ra môi trường nuôi cấy cũng như phương thức tái sinh phù hợp ở các giống khoai lang khác nhau.

Theo các kết quả nghiên cứu đã công bố, môi trường nuôi cấy mô khoai lang được sử dụng phổ biến là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962), có bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau như 2,4-D, kinetin, BAP... Một số tác giả đã sử dụng công thức môi trường nuôi cấy mô khoai lang gồm 2 giai đoạn: Giai đoạn đầu nuôi cấy bổ sung auxin, giai đoạn 2 bổ sung cytokinin là zeatin hoặc TDZ cho hiệu quả tái sinh tốt (Dessai et al., 1995; Gosukonda et al., 1995). Theo Dessai và đồng tác giả (1995), các mảnh lá của khoai lang được cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D 0,2 mg/l trong 3 ngày sau đó được chuyển sang môi trường bổ sung riboside zeatin 0,2 mg/l cho hiệu quả tái sinh tốt ở kiểu gen PI 318846 – 3 (Dessai et al., 1995). Gosukonda và đồng tác giả (1995) thu được tỉ lệ tái sinh chồi đạt 78,25% trong vòng 28 ngày trên môi trường bổ sung thidiazuron 0,2 mg/l. Sử dụng riboside zeatin, và kinetin cho kết quả tần số tái sinh thấp ở kiểu gen nghiên cứu. Mẫu cấy từ lá ngọn cho tần số tái sinh cao hơn so với những mẫu lấy từ các phần cơ bản khác của chồi. Mảnh mô lá cho tần số tái sinh thấp hơn so với cuống lá. Các cây khoai lang tái sinh bằng cách sử dụng thidiazuron lớn mạnh và tạo rễ dễ dàng khi chuyển ra nhà kính (Gosukonda et al., 1995).

Phương thức tái sinh cây in vitro có thể thông qua sự phát sinh cơ quan từ mảnh lá (Dessai et al., 1995; El Abidine Triqui et al., 2008; Gosukonda et al., 1995) và cuống lá, đốt thân (Belarmino et al., 1994; Gosukonda et al., 1995), thông qua đa chồi từ mô sẹo (Anwar et al., 2011), phát sinh phôi soma từ mảnh lá, cuống lá (Zheng et al., 1996), hoặc từ tế bào nuôi cấy huyền phù gen (Xing et al., 2008; Yang et al., 2011; Yu et al., 2007) đã được phát triển và ứng dụng tạo cây khoai lang chuyển gen.

García đã nghiên cứu ảnh hưởng của 151 tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng đến hiệu quả tái sinh cây và chuyển gen của giống khoai lang Jewel bao gồm IAA (0 - 2,0 mg/l), NAA (0,1 - 2,0 mg/l), zeatin riboside (0,11-1,0 mg/l), kinetin (0,1- 2,0 mg/l), BAP (0,25 - 3,0 mg), paclobutanol từ 0,1- 2,0 mg/l (García et al., 2000). Cây khoai lang Jewel chuyển gen ổn định thu được sau 6 đến 10 tuần sau khi nhiễm với *A. tumefaciens* EHA105 và tái sinh cơ quan từ mô sẹo của cuống lá. Tần số chuyển gen thu được trên môi trường tái sinh bổ sung 4FA (flourophenoxyacetic acid) là 20%, môi trường tái sinh bổ sung zeatin là 10%, môi trường bổ sung IAA là 4%. Điều này cho thấy, bổ sung tỷ lệ auxin/cytokinin phù hợp có thể cải thiện sự tái sinh của mô sẹo chuyển gen (Luo et al., 2006).

Theo Gonzalez và đồng tác giả (2008), môi trường phù hợp cho tái sinh cây khoai lang Jewel CE và MSA 78354 chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* là môi trường MS có bổ sung IAA 0,5 mg/l sau bốn tuần nuôi cấy (RF = 2,02), môi trường phù hợp cho tái sinh giống khoai lang CEMSA78354 là MS bổ sung paclobutazol và 1,0 mg/l NAA (RF = 0,98) (Gonzalez et al., 2008).

1.4.2. Tình hình nghiên cứu chuyển gen khoai lang

Những kết quả nghiên cứu về tối ưu quy trình nuôi cấy mô khoai lang chính là tiền đề để

ứng dụng công nghệ chuyển gen vào khoai lang. Trong một vài năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã có nhiều nỗ lực để tối ưu hóa quy trình tái sinh và tạo cây khoai lang chuyển gen. Nhiều phương pháp chuyển gen đã được nghiên cứu sử dụng ở cây khoai lang như phương pháp chuyển gen nhờ xung điện (Dhir et al., 1998; Lawton et al., 2000; Mitchell et al., 1998a; Okada et al., 2001), dùng súng bắn gen (Prakash, Varadarajan, 1992; Yi et al., 2007), chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* (Otani et al., 1993). Tuy nhiên, những phương pháp này được xem là không hiệu quả vì sự xuất hiện thường xuyên của những biến dị, chuyển gen mà không tái sinh, năng suất hoặc hiệu quả thấp và phụ thuộc kiểu gen (Lowe et al., 1994).

Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* đã được sử dụng trong nhiều loài thực vật vì tính hiệu quả, đơn giản và ổn định của nó (Hansen et al., 1997; Joshi, Joshi, 1991; Yu et al., 2007). Chuyển gen ở khoai lang sử dụng *A. tumefaciens* đã được thực hiện từ nhiều loại mô cấy khác nhau (Cipriani et al., 1999; Gama et al., 1996; Kimura et al., 2001; Luo et al., 2006; Mitchell et al., 1998b; Mora'n et al., 1998; Newell et al., 1995; Otani et al., 1998; Otani et al., 2001, 2003; Shimada et al., 2006; Song et al., 2004; Wakita et al., 2001; Xing et al., 2008; Yu et al., 2007). Tuy nhiên, hầu hết các kết quả thu được tần số chuyển gen còn thấp và phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và chỉ thành công trên một vài giống nhất định.

Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới tiến hành nghiên cứu chuyển gen vào khoai lang với nhiều nhóm gen khác nhau, trong đó tập trung chủ yếu vào hướng tạo các dòng khoai lang chuyển gen kháng sâu và côn trùng (Mora'n et al., 1998; Newell et al., 1995), tạo cây khoai lang kháng thuốc diệt cỏ (Anwar et al., 2011; Choi et al., 2007; Maria et al., 2009; Yi et al., 2007; Zang et al., 2009) và kháng virus (Okada et al., 2001), các dòng khoai lang cải thiện chất lượng dinh dưỡng (López et al. 1996; Wakita et al. 2001), tăng hàm lượng tinh bột (Shimada et al., 2006), chuyển gen làm tăng khả năng chống chịu stress phi sinh học (Lim et al., 2007).

Yi và đồng tác giả (2007) đã tạo được cây khoai lang mang gen bar kháng thuốc diệt cỏ bằng phương pháp bắn gen vào callus phát sinh phôi bắt nguồn từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Yi et al., 2007). Zang và đồng tác giả (2009) cũng đã tạo được cây khoai lang chuyển gen bar nhờ chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 thông qua nuôi cấy huyền phù phát sinh phôi. Khi phân tích sự có mặt của gen GUS và thực hiện phản ứng PCR thu được tần số chuyển gen cao 86,5% cây chuyển gen, số bản copy là từ 1 đến 3 (Zang et al., 2009). Tuy nhiên, ở đây các tác giả chưa đánh giá được tính kháng thuốc diệt cỏ của các dòng cây chuyển gen.

Yu và đồng tác giả (2007) đã chuyển gen ở giống khoai lang *Ipomoea batatas* L. cv. Lizixiang bằng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 và tiến hành nuôi cấy huyền phù. Kết quả thu được 90,37% cây chuyển gen, số bản copy của T-ADN là từ 1 đến 4, 100% cây chuyển gen sống sót khi trồng trong nhà kính và khi đưa ra ngoài đồng ruộng, không quan sát thấy có sự biến dị về hình thái của các cây *ex vitro* (Yu et al., 2007).

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây cũng đã có một số viện nghiên cứu đầu ngành như Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam thực hiện các đề tài, các dự án nghiên cứu trên đối tượng khoai lang và cũng đã thu được một số kết quả bước đầu.

Viện Công nghệ Sinh học đã thực hiện một số đề tài như: Phân lập gen và tạo cây khoai lang chuyển gen kháng bọt hà (Hợp tác ISAAA, từ 1997 đến nay). Đề tài "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống kháng sâu bệnh và có chất lượng cao ở cây khoai lang (2003)", đề tài nhánh trong đề tài KC-04-22: "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống kháng sâu bệnh và có chất lượng cao ở một số cây có củ" do Viện Di truyền Nông

nghiệp chủ trì. Một số kết quả nổi bật của đề tài là đã phân lập và thiết kế gen diệt bọt hà ở khoai lang, đã chuyển gen và đánh giá cây chuyển gen ở phòng thí nghiệm và nhà lưới, hoàn thiện quy trình tái sinh cây chuyển gen và áp dụng thử nghiệm. Những kết quả này phục vụ tốt cho các nghiên cứu về chuyển gen thực vật nói chung và đặc biệt là chuyển gen ở khoai lang.

Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật vào nghiên cứu tạo giống sạch bệnh và tạo giống khoai lang mới bằng chuyển gen sẽ tạo ra triển vọng mới trong việc tăng năng suất cũng như diện tích khoai lang tại Việt Nam. Đã có một số nghiên cứu về sự tái sinh in vitro và chuyển gen của một số giống khoai lang Việt Nam (Phạm Bích Ngọc et al., 2002) nhưng kết quả thu được còn hạn chế, đặc biệt là chưa tập trung hoàn thiện hệ thống tái sinh của các giống khoai lang địa phương có năng suất và chất lượng tốt.

1.5. Phương pháp sàng lọc và đánh giá cây chuyển gen

1.5.1 Sàng lọc cây chuyển gen bằng chất chọn lọc

Sàng lọc sau khi chuyển gen bằng chất chọn lọc đặc hiệu được xem là bước đi đầu tiên và đặc biệt quan trọng để xác định được tế bào mang gen chuyển đồng thời giúp làm giảm được công sức cho các phân tích tiếp theo. Muốn vậy cần thiết phải lập được môi trường chọn lọc thích hợp nhằm loại bỏ các tế bào không mang gen chuyển, đồng thời giữ lại được hầu hết các tế bào có mang gen chuyển [15].

Để chọn lọc các tế bào mang gen biến nạp, trong vector biến nạp thường phải chứa các gen chọn lọc như: nptII – kháng kanamycine, hyg – kháng hygromycin, str/spc – kháng streptomycin và spectinomycin, bar – kháng thuốc trừ cỏ PPT (phosphinothricin)... Các loại vector này đã được ứng dụng và mang lại thành công trong việc chọn lọc các tế bào mang gen chuyển ở nhiều đối tượng cây trồng như cây bông vải, cây hồng, cây thuốc lá, lúa... [3], [13], [21], [26].

Hiện nay, với mục tiêu an toàn sinh học, an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường, người ta đã đưa vào vector chuyển gen các gen chỉ thị chọn lọc ít độc hơn như pmi mã hóa cho enzyme phosphomannose isomerase, hệ thống chọn lọc sử dụng đường mannose. Hệ thống chọn lọc này đã mang lại thành công trên các đối tượng như táo, cam quýt, lúa ... [28], [30], [37], [50]. Tuy nhiên đến nay trên đối tượng cây thông vẫn chưa có kết quả nào được công bố.

Để sử dụng được các chất chọn lọc như kháng sinh, thuốc diệt cỏ hay đường trong hệ thống chọn lọc tế bào chuyển gen cần xác định được ngưỡng nồng độ chọn lọc thích hợp với từng loại tế bào, mô hay loài cây. Các thí nghiệm này cần tiến hành trước khi thực hiện chuyển gen vào một đối tượng cây trồng nào đó. Theo Brukhin và cộng sự [33], để công tác chọn lọc có hiệu quả đồng thời không tiêu diệt cả các tế bào mang gen chuyển thì môi trường chọn lọc cần thiết lập một ngưỡng nồng độ thấp nhất có thể loại bỏ được khoảng 90% các cá thể không mang gen chuyển.

1.5.2. Phân tích cây chuyển gen gus bằng nhuộm hoá mô tế bào

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về khoai lang

1.1.1. Nguồn gốc và vị trí phân loại

Khoai lang thuộc bộ Solanales, họ Convolvulaceae, chi *Ipomoea*, loài *Ipomoea batatas*. Khoai lang là một loài cây nông nghiệp với các rễ củ lớn, chứa nhiều tinh bột, có vị ngọt, được gọi là củ khoai lang. Khoai lang có quan hệ họ hàng xa với khoai tây (*Solanum tuberosum*) và quan hệ họ hàng rất xa với khoai môn (một số loài trong chi *Dioscorea*).

Nhiều nhà khoa học cho rằng khoai lang được thuần hóa từ hơn 5000 năm trước và có nguồn

gốc từ Mỹ La Tinh (Hoàng Thị Sản, 2002; Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Đình Sy, 1998). Khoai lang được du nhập vào Trung Quốc cuối thế kỷ 16. Do khả năng thích ứng rộng và dễ nhân giống khoai lang đã được mở rộng ở châu Á, châu Phi, châu Mỹ La Tinh vào thế kỷ 17 và 18.

Nó cũng được biết tới trước khi sự thám hiểm của người phương tây tới Polynesia, sau đó nó phổ biến sang các nước ở Châu Âu như: Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc, Philippin, Indonesia, Việt Nam.

Khoai lang là cây lương thực quan trọng của người Mayan ở Trung Mỹ và người Peruvian ở các vùng núi Andet (Nam Mỹ). Khoai lang được khám phá bởi Christophe Columbus trong cuộc thám hiểm tìm ra châu Mỹ năm 1492. Khoai lang phổ biến rộng bằng 2 con đường (Bùi Huy Đáp, 1984):

Ø Con đường 1: Các nhà buôn Tây Ban Nha đưa khoai lang vào châu Âu. Sau đó được truyền tới châu Phi, rồi vào Ấn Độ, phía Tây Ấn (châu Á).

Ø Con đường 2: Người Tây Ban Nha mang từ Trung Mỹ tới Philippines. Sau đó, đưa tiếp tục đến Châu Phi. Khoai lang được đưa vào Trung Quốc từ Philippin và xuất hiện ở Fukien năm 1594. Con đường khác vào Trung Quốc là do người Tây Ban Nha đưa vào vùng Combatfami năm 1674. Một người Anh đưa khoai lang vào Nhật năm 1615. Khoai lang tiếp tục được đưa vào Malaysia và các nước Nam Á, Đông Nam Á. Khoai lang được nhập vào Việt Nam theo con đường từ Phúc Kiến - Trung Quốc khoảng cuối thế kỷ 16 (Bùi Huy Đáp, 1984; Đinh Thế Lộc, 1995;1997).

Hiện nay, khoai lang được phát triển ở trên 100 quốc gia nhiệt đới và ôn đới ẩm. Ở Việt Nam, khoai lang được trồng rất phổ biến, trước đây chủ yếu ở các vùng đồng bằng đất bãi ven sông, hiện nay khoai lang đã được trồng nhiều ở các vùng đồi, trung du từ Bắc vào Nam.

Hình 1.1. Giống khoai lang KB1

(<http://www.fcric.com.vn/images/c198/33>)

1.1.2. Đặc điểm sinh thái và di truyền

Khoai lang là cây hai lá mầm và là cây trồng lục bội với số bội thể $2n = 90$, là loài cây thân thảo dạng dây leo sống hằng năm, thân mềm bò hoặc leo, dài 2 - 3 m, các lá mọc so le hình tim hay xẻ thùy chân vịt, các hoa có tràng hợp và kích thước trung bình. Hoa màu tím nhạt hay trắng, mọc thành xim ít hoa ở đầu cành hay nách lá. Rễ củ ăn được có hình dáng thuôn dài và thon, lớp vỏ nhẵn nhụi có màu từ đỏ, tím, nâu hay trắng. Lớp củi thịt có màu từ trắng, vàng, cam hay tím (Hoàng Thị Sản, 2002; Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Đình Sy, 1998).

Khoai lang được trồng từ lâu đời ở nước ta, có phổ thích nghi rất rộng, nhưng tốt nhất là trồng trên đất pha cát, lượng mưa năm khoảng 1000 mm, có khả năng chịu hạn, chịu đất xấu. Khoai lang là cây giao phấn, ngày ngắn, không ra hoa khi ngày dài quá 13 giờ 30 phút, do đó ít khi ra hoa ở những vùng có vĩ độ ôn đới trên 30 độ Bắc hay Nam. Ở vùng nhiệt đới, nó dễ ra hoa, có hạt, có sức sống, nhưng thường chỉ trồng bằng các đoạn dây gọi là hom.

Khoai lang là cây trồng đặc biệt có thể trồng được ở những nơi có điều kiện canh tác khó khăn, dễ trồng, dễ chăm sóc, ít đầu tư phân bón, thuốc bảo vệ thực vật. Nhiệt độ thích hợp trong quá trình sinh trưởng phát triển của cây là từ 15-30 oC, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ trung bình khoảng 24 oC, độ ẩm thích hợp từ 60-70%. Khoai lang có khả năng chịu đất chua, nó sinh trưởng bình thường ở pH = 4,5 - 8.

Khoai lang được coi là cây trồng thân thiện với môi trường vì đầu tư thâm canh thấp đặc biệt là yếu tố nitơ, có khả năng sinh trưởng nhanh, che phủ đất, chống xói mòn, khoai lang có khả năng đặc biệt trồng được dưới tán che bóng, xen canh với cây khác. Tuy vậy, phải dựa vào các đặc điểm sinh trưởng phát triển của các giống khoai lang mà chọn giống phù hợp với từng điều kiện khí hậu, từng mùa vụ, từng vùng để đạt năng suất cao nhất.

1.1.3. Đặc điểm hình thái

Khoai lang là cây lương thực ăn củ và lấy dây lá, trồng hàng năm. Khoai lang là loài cây thân thảo dạng dây leo, có các lá mọc so le hình tim hay xẻ thùy chân vịt, các hoa có tràng hợp và kích thước trung bình, hoa trắng, vàng hay tím, hình phễu. Củ hình thoi do rễ phồng lên, chứa tinh bột và đường, vỏ củ màu trắng, vàng hay đỏ tím, thịt củ trắng, vàng hay tím nhạt tùy theo giống. Hoa khoai lang thuộc loại hoa lưỡng tính. Quả khoai lang thuộc loại quả sóc, mỗi quả có từ 1-4 hạt màu đen, vỏ dày, khó nảy mầm. Khoai lang trồng ở vùng nhiệt đới thường có thân bò, trồng ở vùng ôn đới thường có dạng bụi.

1.1.4. Giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế của cây khoai lang

Giá trị dinh dưỡng:

Khoai lang chứa nhiều loại chất dinh dưỡng và vitamin khác nhau: 8 - 29% tinh bột, 7,5% glucose; khi còn tươi củ chứa 1,0 - 2,4% protein, 1,8 - 6,4 % chất béo. Trong tro có Mn, Ca, Cu, các vitamin A, B, C, 4,24% tanin, 1,375% pentosan. Khi đã phơi ở chỗ thoáng mát, trong củ có inosit, dextrin, axit chlorogenic, phytosterol, carotin, adenin, betain, cholin. Dây khoai lang cũng có chứa adenin, betain, cholin.

Bảng 1.1. Thành phần và hàm lượng dinh dưỡng trong củ khoai lang

Hàm lượng

Phần trăm hoặc mg/100g

Protein

1,0-2,4

Chất béo

1,8-6,4

Tinh bột

8,0-29

Glucose

0,5-7,5

Đường khử

0,5-7,5

Tro

0,9-1,4

Caroten

4 mg/100 g

Thiamin(B1)

0,1 mg/100 g

Vitamin C

25 g/100 g

Riboflavin

0,06 mg/100 g

Ngoài ra, trong khoai lang tươi còn có nhiều vitamin và muối khoáng. Khi phơi khô rút gần hết nước, giá trị dinh dưỡng của cây khoai lang còn cao hơn. Trong 100g khoai lang khô có 11g nước, 2,2 g protit, 0,5 g lipit, 80g gluxit, 3,6 g xelulaza và có thể cung cấp cho cơ thể sống 342 calo (Đình Thế Lộc, 1995;1997; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Khoai lang ngày càng được thế giới quan tâm và được coi là cây trồng đảm bảo an ninh lương thực vì có hàm lượng vitamin và dinh dưỡng cao. Hiện nay ở châu Phi, khoai lang đang được sử dụng như một vũ khí hữu hiệu để chống lại nạn thiếu vitamin A và C đang lan rộng. Theo CIP (June, 2000), nạn thiếu vitamin A ở châu Phi đã gây mù lòa và thậm chí cướp đi sinh mạng của 250.000 - 500.000 trẻ em mỗi năm.

Trên 90% sản phẩm khoai lang được sản xuất ở các nước đang phát triển. Khoảng gần một nửa sản phẩm khoai lang ở châu Á được sử dụng làm thức ăn gia súc, phần còn lại được sử dụng làm lương thực cho người và chế biến. Ở những nước đông dân cư vùng nửa đồng bằng của Tây Phi cây khoai lang được ví là "người bảo hộ của trẻ em". Lịch sử đã chứng minh khoai lang là cây trồng cứu đói vào những thời kỳ khủng hoảng của thế giới như thời kỳ sau Thế chiến thứ 2, sau trận động đất tàn phá năm 1990 ở Bắc Luzon, bạo loạn nội chiến tại Rwanda vài năm gần đây... Ngày nay, khoai lang ngày càng trở nên quan trọng do nhu cầu tiêu thụ tinh bột khoai lang ở thị trường châu Á tăng cao.

Giá trị kinh tế:

Các giống khoai lang giàu tinh bột được sử dụng theo các hướng sau đây

- Làm nguyên liệu để chế biến các sản phẩm công nghiệp: Tinh bột khoai lang có thể chế biến sâu thành các sản phẩm tinh bột biến tính, các sản phẩm hoá công, các sản phẩm lên men thủy phân, được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp thực phẩm, dệt, giấy, vật liệu xây dựng, cao su nhân tạo...

- Làm nguyên liệu lý tưởng để sản xuất thức ăn chăn nuôi có giá cạnh tranh cao. Với công nghệ mới, khoai lang khô thông qua công nghệ vi sinh để chế biến thức ăn vi sinh giàu đạm, có hàm lượng protit cao tới trên 40%, tương đương hàm lượng đạm trong đậu tương. Nguyên liệu giàu đạm hiện nay chủ yếu dựa vào đậu tương và bột cá nhập khẩu. Nếu sử dụng thức ăn vi sinh giàu đạm từ khoai lang để phối chế với các nguyên liệu chất bột khác thì sẽ giảm hẳn nhu cầu nhập khẩu đậu tương và bột cá đắt tiền, là những mặt hàng mà Việt Nam không có lợi thế phát triển như Mỹ, Braxin, Achentina và Peru (Nguyễn Công Tạn, 2012).

- Làm nguyên liệu để sản xuất ethanol sinh học có giá cạnh tranh, thân thiện với môi trường, góp phần phát triển năng lượng tái tạo thay thế năng lượng hóa thạch. Cây khoai lang được coi là cây vua năng lượng. Hiệu suất sản xuất ethanol sinh học từ khoai lang cao hơn hẳn mía đường, cao lương, ngô, sắn và khoai tây. Với năng suất khoai lang có tinh bột đạt 70 tấn/ha/vụ thì 1 vụ khoai có thể sản xuất 10 tấn ethanol/ha, nếu 1 năm làm 2 - 3 vụ có thể sản xuất 20 tấn- 30 tấn ethanol/ha năm, tạo ra triển vọng phát triển ethanol sinh học có giá cạnh tranh, không tranh chấp lương thực của loài người. Với công nghệ sản xuất ethanol sinh học từ khoai lang, thông qua chu trình tuần hoàn khép kín, không thải ra độc tố, lại còn sản sinh khí CH₄ để phát điện, đem lại lợi ích to lớn về kinh tế gắn với bảo vệ môi trường (Bùi Huy Đáp, 1984; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Với các công năng như trên, khoai lang đang là một sản phẩm có thị trường tiêu thụ khá rộng lớn. Không chỉ trong nước mà còn xuất khẩu đi nhiều nước trên thế giới. Khoai lang là một cây trồng hứa hẹn mang lại hiệu quả kinh tế cao. Khoai lang đầu tư ít, bán được giá, lợi nhuận đem lại cho nông dân chắc chắn cao hơn hẳn những cây trồng ngắn ngày khác ở nước ta.

1.1.5. Tình hình sản xuất khoai lang trên thế giới và Việt Nam

Bảng 1.2. Diện tích, năng suất, sản lượng khoai lang năm 2012 (<http://gso.gov.vn/default.aspx?tabid=717>)

Chỉ tiêu

Khu vực

Diện tích (ha)

Năng suất (hg/ha)

Sản lượng (tấn)

Thế giới

8 087 116

127543

103 145 500

Châu Phi

3 506 508

51332

17 999 686

Châu Mỹ

264 230

122786

3 244 382

Châu Á

4 177 239

194139

81 096 554

Châu Âu

4054

126687

51359

Châu Đại Dương

135 084

55782

753 520

Hg/ha: hectogam/ha (1hg = 0,1kg = 0,001 tạ)

Khoai lang là cây lương thực có địa bàn phân bố rộng, thích ứng với các điều kiện nhiều vùng sinh thái khác nhau, phân bố rộng rãi ở nhiều châu lục trên thế giới, đặc biệt là các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới.

Hiện nay khoai lang đã được trồng ở trên 100 quốc gia trên thế giới như ở châu Á (31 nước), châu Phi (39 nước) và châu Mỹ La Tinh (31 nước). Theo thống kê của FAO (2012), tổng sản lượng thu hoạch khoai lang tập trung chủ yếu ở châu Á với xấp xỉ 81,1 triệu tấn/ năm, trong đó Trung Quốc là nước có tổng sản lượng cao nhất thế giới với 73,14 triệu tấn và năng suất 21 tấn/ha. Trong khi ở châu Phi sản lượng là 17,99 triệu tấn với năng suất trung bình tương đối thấp là 5,1 tấn/ha, châu Mỹ có sản lượng là 3,2 triệu tấn và năng suất là 12,28 tấn/ha. Diện tích canh tác khoai lang không ngừng tăng trong những năm vừa qua.

Bảng 1.3. Diện tích và sản lượng khoai lang của 4 vùng sinh thái và cả nước
(<http://www.fcvi.com.vn/images/c198/33>)

Chỉ tiêu

Vùng

Năm 2009

Năm 2010

Năm 2011

Diện tích (ha)

Sản lượng
(nghìn tấn)

Diện tích
(ha)

Sản lượng
(nghìn tấn)

Diện tích
(ha)

Sản lượng (nghìn tấn)

Cả nước

146,6

1.211,3

150,8

1.318,5

148,5

1.390,6

Đồng bằng sông Hồng

22,8

195,1

27,0

247,0

26,1

241,9

Trung du và miền núi phía Bắc

38,1

239,1

38,9

256,3

37,7

251,0

Bắc Trung Bộ và Duyên hải miền Trung

55,4

330,7

53,9

340,6

49,6

313,8

Đồng bằng sông Cửu Long

14,2

279,4

14,9

307,1

18,7

410,5

Ở nước ta, khoai lang chiếm một vị trí quan trọng trong sản xuất lương thực, đứng thứ 3 sau lúa và ngô. Khoai lang là cây lương thực dễ trồng, đầu tư thấp nhưng có tiềm năng, năng suất cao. Từ lâu, nhân dân ta đã có truyền thống sử dụng khoai lang làm lương thực thực phẩm và thức ăn gia súc (tươi hoặc phơi khô), ngọn và lá sử dụng làm rau xanh. Hiện nay, do lượng khoai lang

làm lương thực cho người giảm, ngành chăn nuôi ngày càng phát triển, nên ngoài những giống khoai lang có năng suất củ cao, các giống thuộc nhóm có năng suất thân lá cao đang được người sản xuất quan tâm. Những giống có hàm lượng đường, hàm lượng protein cao làm nguyên liệu cho chế biến (bánh kẹo, chips khoai lang,...) cũng đang được chú ý.

Những năm gần đây, do việc chuyển đổi cơ cấu cây trồng nên diện tích khoai lang ở nhiều vùng bị thu hẹp lại. Tuy nhiên, ở những vùng đất nghèo dinh dưỡng, không chủ động tưới nước, cây khoai lang vẫn chiếm một diện tích khá lớn. Ở những vùng sản xuất lúa khó khăn, vùng đất bạc màu, đất cát ven biển khoai lang đã chiếm vị trí ngang hoặc cao hơn sản xuất lúa, đặc biệt khoai lang là cây trồng hiệu quả nhất khi mùa màng bị thiệt hại do thiên tai, bão lụt vì nó góp phần đảm bảo an ninh lương thực (Bùi Huy Đáp, 1984; Nguyễn Công Tạn, 2012).

Riêng đối với vùng Bắc Trung Bộ, khoai lang là cây trồng chính trên đất cát ven biển và là cây trồng không thể thiếu trong cơ cấu cây trồng của vùng đất bãi, đất phù sa bồi đắp, ở những vùng ven biển khoai lang còn là cây có tác dụng khai hoang và làm thức ăn gia súc quan trọng. Trước đây có những năm diện tích khoai lang cả nước đã đạt tới 450.000 ha.

Diện tích khoai lang của Việt Nam dự kiến ổn định khoảng 188,4 nghìn ha nhưng sẽ tăng năng suất và sản lượng khoai lang bằng cách chọn tạo và phát triển các giống khoai lang tốt có năng suất củ tươi và hàm lượng tinh bột cao, xây dựng và hoàn thiện quy trình kỹ thuật canh tác khoai lang bền vững và thích hợp vùng sinh thái, đảm bảo thu nhập cho người dân, nhất là các hộ nghèo, các hộ vùng sâu vùng xa.

1.1.6. Nguồn gen giống khoai lang Việt Nam

Hầu hết những nước trồng nhiều khoai lang trên thế giới đều có bộ sưu tập nguồn gen giống khoai lang. Nơi lưu giữ nguồn gen khoai lang lớn nhất toàn cầu là Trung tâm Khoai tây Quốc tế (Centro Internacional de la Papa - CIP) với tổng số 7007 mẫu giống khoai lang được duy trì năm 2005. Trong số này có 5920 mẫu giống khoai lang trồng (*Ipomoea batatas*) và 1087 mẫu giống khoai lang loài hoang dại (*Ipomoea trifida* và các loài *Ipomoea* khác). Việc duy trì nguồn gen ở CIP được thực hiện trong ống nghiệm, trên đồng ruộng, bảo quản bằng hạt và được đánh giá theo tiêu chuẩn quốc tế.

Nguồn gen giống khoai lang Việt Nam chủ yếu được thu thập, đánh giá và bảo tồn tại Trung tâm Tài nguyên Thực vật, thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam với 528 mẫu giống đã được tư liệu hoá (trong đó có 344 mẫu do Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc chuyển đến), Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (FCRI) có 118 mẫu giống, Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc hiện có 78 mẫu giống, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh có 30 mẫu giống.

Từ 1999 - 2006, Trung tâm Khoai tây Quốc tế tại Hà Nội (CIP-Hanoi) và CIP Peru hợp tác hỗ trợ về kinh phí và vật liệu giống phục vụ cho công tác nghiên cứu, chọn tạo giống và phát triển cây khoai lang tại Việt nam, các cơ quan nghiên cứu như Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam (VASI cũ, nay là VAAS), Viện Cây lương thực - Cây thực phẩm (FCRI) và Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội đã chọn tạo ra nhiều giống có triển vọng theo các hướng sử dụng: Lai tạo theo hướng hàm lượng chất khô cao; Chọn tạo giống theo hướng năng suất thân lá và năng suất củ cao.

Bảng 1.4. Hiện trạng nguồn gen khoai lang tại Việt Nam năm 2009 (Hoàng Kim, 2011)

Cơ quan, địa điểm

Năm

Số mẫu ban đầu

Số mẫu bảo tồn

VASI (Hà Nội)

1993-2004

-

528

FCRI (Hải Dương)

2004

-

118

1993

HARC (Đồng Nai)

1993

344

78

1993-2006

12.071 hạt lai

UAF(Hố Chí Minh)

2006-2009

-

Các nhà chọn tạo giống đã chọn ra nhiều giống mới có triển vọng như: K1 (Số 59), K2 (Số 8), K4 (V15-70), K51, KL5, KL1, KB1, VX-37, HL4, TV1, H12, giống khoai lang cực nhanh, giống khoai lang 143. Hai giống khoai lang TV1 và H12 là 2 giống mới do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam chọn lọc có năng suất và chất lượng ăn tươi cao đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận giống tạm thời năm 2004. Mặc dù vậy, việc sử dụng giống vào trong sản xuất chưa nhiều, kỹ thuật thâm canh còn một số khâu vẫn cần phải hoàn thiện để đảm bảo cho 2 giống phát triển bền vững trong vụ Đông và vụ Hè Thu của các vùng ven đô, Trung du và Duyên hải Bắc Trung Bộ.

Ở các tỉnh phía Nam, các giống khoai lang hiện trồng phổ biến là HL518 (Nhật đỏ), HL491 (Nhật tím), Murasa kimasari (Nhật tím), Kokey 14 (Nhật vàng), HL497 (Nhật cam), HL4, Hoàng Long, Chiêm Dâu, Trùi Sa, Bí Đ à Lạt, Dương Ngọc, Tàu Nghẹn, Trùi Sa (Cần Sa), Khoai Sữa, Khoai Gạo.

Những năm gần đây, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh cũng đánh giá và tuyển chọn 24 giống khoai lang khảo nghiệm toàn cầu trong chương trình hợp tác với CIP và khảo sát các giống khoai lang nhiều dây lá, năng suất bột cao cho hướng chế biến cồn trong chương trình hợp tác với công ty Technova và công ty Toyota Nhật Bản (Hoàng Kim, 2008).

Những giống khoai lang phẩm chất ngon đang được đánh giá và tuyển chọn trong đề tài “Thu thập, khảo sát, so sánh và phục tráng giống khoai lang tại huyện Xuân Lộc tỉnh Đồng Nai 2008-2010”. Đây là nội dung hợp tác giữa Sở Khoa học Công nghệ Đồng Nai, Viện Sinh học Nhiệt đới, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh và Phòng Nông nghiệp Xuân Lộc. Kết quả bước đầu có HL518, HL491, Kokey 14, HL284, HL536 (CIP 083-14), HL574 (Cao sản), HL585, HL597.

Kết quả nghiên cứu khác liên quan đến việc đánh giá các tập đoàn giống khoai lang do Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Bắc Trung Bộ chủ trì đã lập được danh sách 3 tập đoàn giống khoai lang thuộc: (1.) Nhóm các giống năng suất cao; (2.) Nhóm các giống chất lượng cao và (3.) Nhóm giống chuyên làm rau xanh. Đây là tiền đề tốt để chúng tôi phối hợp lựa chọn giống trong nhóm giống năng suất và nhóm giống chất lượng cao những đối tượng thích hợp của bộ hạ để nghiên cứu chuyển gen kháng bộ hạ.

Khái quát về giống khoai lang KB1: Giống khoai lang KB1 được chọn lọc từ tổ hợp lai tự nhiên của giống mẹ Regal có nguồn gốc từ Mỹ từ năm 1993 tại Viện Cây lương thực. Giống được công nhận là giống quốc gia theo Quyết định số 5310 QĐ/BNN-KHCN ngày 29 tháng 11 năm 2002.

Giống KB1 có đặc điểm chính sau:

- Giống khoai lang KB1 có dạng thân nửa đứng lá hình tim màu xanh nhạt, lá non màu tím.
- Giống khoai lang KB1 có củ to và khá đồng đều, màu vỏ vàng nhạt, màu ruột củ trắng ngà.
- Năng suất củ có thể đạt 15 - 30 tấn/ ha, cao hơn Hoàng long từ 20 - 40%. Chất lượng củ của giống khoai lang KB1 tương đương Hoàng long.

A

B

C

D

Hình 1.2. Một số giống khoai lang Việt Nam:
A) KB1; B) Chiêm Dâu; C) KL5; D) K51

Hình 1.3. Hình thái củ giống khoai lang KB1 và Hoàng Long
(<http://www.fcrl.com.vn/images/c198/33>)

1.2. Phương pháp nuôi cấy mô - tế bào thực vật

Trong mấy thập kỉ qua nuôi cấy mô tế bào thực vật đã phát triển mạnh mẽ ở nhiều quốc gia trên thế giới (cả ở các nước phát triển và đang phát triển). Đây là công cụ cần thiết trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của ngành sinh học

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào thực vật (totipotency)

Năm 1838, Schleiden và Schwann đưa ra học thuyết tế bào. Hai khía cạnh quan trọng của học thuyết tế bào: 1) Ngoài tính đa dạng cao của cơ thể sống, mọi sinh vật đều gồm tế bào và 2) mọi

tế bào đều tương tự về cấu trúc và chức năng.

Năm 1902, Haberlandt - nhà thực vật học người Đức là người đề xướng học thuyết về tính toàn năng của tế bào.

Tính toàn năng của thực vật: Mỗi tế bào của bất kỳ cơ thể sinh vật nào đều mang toàn bộ thông tin di truyền của cơ thể đó và có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi

Tính toàn năng của TBTV: là khả năng của của tế bào đã biệt hoá (trừ một số tế bào đã biệt hoá sâu như ống mạch, mao dẫn) có khả năng thể hiện toàn bộ thông tin di truyền và có thể phát triển thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện thuận lợi giống như chu trình phát triển của phôi.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật in vitro đã hình thành từ vài thập kỷ trước mà cơ sở của nó là giả thuyết của nhà thực vật học người Đức Haberland (1902): Tất cả các tế bào của thực vật đều có tính toàn năng (totipotency), nghĩa là mỗi tế bào đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền của cơ thể. Theo Haberland mỗi tế bào thực vật đều có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi. Ông chính là người đầu tiên đề xuất phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật để chứng minh tính toàn năng của tế bào. Ông đã tiến hành thí nghiệm với các tế bào mô mềm, tế bào biểu bì, tiếc rằng đã thất bại do chúng không thể phân chia được.

Năm 1922, Kotte và Robbins lặp lại các thí nghiệm của Haberland và đã thành công nuôi được đỉnh sinh trưởng tách từ đầu rễ của cây ngô, đậu Hà lan tạo ra hệ rễ nhỏ có cả rễ phụ trong 12 ngày trên môi trường lỏng có chứa đường glucosơ, muối khoáng. Ông đã chứng minh hiệu quả của dịch chiết nấm men cho sinh trưởng và sự cần thiết của các vitamin.

1.2.2. Các giai đoạn phát triển của phương pháp nuôi cấy mô tế bào

a) Pha phát triển sinh lí

Năm 1934, White nuôi cấy thành công đầu rễ cà chua trong một thời gian dài trên môi trường lỏng có chứa muối khoáng, đường glucose và nước chiết nấm men. Gautheret đã thành công trong nuôi cấy mô tượng tầng và tìm được môi trường thích hợp.

- Khám phá ra vai trò thúc đẩy của hàng loạt các vitamin nhóm B (B1- Thiamin HCl; B6- Pirydoxin HCl, axit nicotinic – B3).

- Went và Thimann tìm ra được chất KTST đầu tiên là IAA. Sau đó, Miller và Skoog trong khi nuôi cấy mô lõi cây thuốc lá đã xác định được vai trò của kinetin trong sự kích thích phát triển mô.

- 1939, Gautheret và Nobercourt đã duy trì được sinh trưởng của mô sẹo cà rốt trong một thời gian dài. Năm 1941, Van Overbeck đã chứng minh tác dụng tốt của nước dừa trong nuôi cấy cây họ cà. Năm 1952, Steward và Milles xác định tầm quan trọng của nước dừa trong nuôi cấy mô sẹo và phát sinh phôi ở cà rốt. Cũng trong khoảng thời gian này (1950), nhiều chất KTST nhóm auxin được nghiên cứu và tổng hợp thành công: 2,4D, NAA. Năm 1954, Skoog đã phát hiện ra kinetin- có trong chế phẩm thủy phân dịch cá có tác dụng kích thích sự phân bào.

Việc phát hiện ra các chất KTST cùng với các loại vitamin và nước dừa là những những bước tiến có ý nghĩa trong giai đoạn 2 của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Năm 1957, Skoog và Miller đã chứng minh sự biệt hoá của rễ, chồi trong nuôi cấy mô tuỷ cây thuốc lá phụ thuộc vào nồng độ tương đối của auxin/cytokinin. Thành công này có ý nghĩa vô cùng quan trọng dẫn đến nhiều phát hiện quan trọng là tiền đề cho giai đoạn phát triển tiếp theo của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Trong giai đoạn mới từ năm 1960 trở lại đây, cùng với việc nuôi cấy mô tế bào đơn, tế bào trần (protoplast), kỹ thuật nuôi cấy bao phấn, hạt phấn được phát triển mạnh

- 1960, Morel đã nuôi cấy đỉnh sinh trưởng phong lan và tạo được các protocorm, và các

protocorm này trong các điều kiện nhất định có thể phát triển thành cây lan hoàn chỉnh và sạch bệnh.

- 1960, Cooking đã thu được các tế bào trần dùng cho nuôi cấy mô tế bào thực vật xử lý bằng enzyme xenllulaza

- 1966, Guha và cs đã tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn cây cà độc dược (*Datura inoxia*). 1967, Borgin và Nitsch cũng đã thành công ở cây thuốc lá

Việc tạo cây đơn bội thành công ở nhiều loài thực vật thông qua nuôi cấy bao phấn và hạt phấn đã đóng góp rất lớn cho nghiên cứu di truyền và lai tạo giống.

Từ 1970 trở đi, các nhà khoa học đã rất chú ý vào triển vọng của kỹ thuật nuôi cấy protoplast khi Takebe và cs (1971) tạo được cây hoàn chỉnh đầu tiên từ protoplast.

b) Giai đoạn phát triển di truyền

Melcher và cs đã lai tạo thành công protoplast của cà chua và protoplast khoai tây, mở ra một triển vọng mới trong lai xa ở thực vật.

Ngoài ra, trong những điều kiện nhất định, protoplast có khả năng hấp thu các phân tử lớn, các cơ quan tử từ bên ngoài, do đó chúng là đối tượng lí tưởng cho các nghiên cứu di truyền thực vật.

c) Giai đoạn phát triển chuyển gen

Năm 1985, Horsch và cs đã chuyển gen vào thực vật bằng *Agrobacterium tumerfaciens* và tạo cây chuyển gen đầu tiên. Năm 1986, lần đầu tiên tại pháp và Mĩ cây thuốc lá chuyển gen khángthuốc diệt cỏ đứ ra trồng thử nghiệm trên đồng ruộng. Diện tích cây trồng chuyển gen không ngừng tăng lên trên toàn cầu. Năm 1996, diện tích cây trồng chuyển gen trên toàn cầu mới chỉ là 1,7 triệu ha, đến năm 1997 con số này đã là 11 triệu ha. Năm 2001 con số này đã lên đến 44 triệu ha và năm 2004 diện tích cây trồng chuyển gen toàn cầu đã lên đến 81 triệu ha. Đến năm 2010, con số này đã lên đến 148 triệu ha (James, 2010)

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy mô tế bào thực vật

1.2.3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Nghiên cứu về môi trường nuôi cấy giữ một vị trí quan trọng trong lịch sử phát triển của nuôi cấy mô – tế bào. Cơ sở cho việc xây dựng các môi trường nuôi cấy là việc xem xét các thành phần cần cho sự sinh trưởng và phát triển của cây. Đã có rất nhiều loại môi trường được nghiên cứu phù hợp cho việc nuôi cấy từng loài, từng bộ phận và tùy theo mục đích nuôi cấy. Cho đến nay có hàng trăm loại môi trường dinh dưỡng đã được xây dựng và thử nghiệm có kết quả. Hầu hết các loại môi trường đều bao gồm những thành phần chính sau:

Thành phần khoáng

Các nguyên tố khoáng dùng trong môi trường dinh dưỡng nuôi cấy mô – tế bào thực vật được chia thành hai nhóm theo hàm lượng sử dụng: nhóm đa lượng và nhóm vi lượng.

- Nhóm đa lượng: gồm các nguyên tố như Nitơ, lưu huỳnh, photpho, magiê, canxi. Chúng đặc biệt cần thiết đối với quá trình sinh trưởng và trao đổi chất của tế bào.

- Nhóm vi lượng gồm các nguyên tố như sắt, mangan, bo, molybden... là nhóm nguyên tố được sử dụng với nồng độ rất nhỏ nhưng lại không thể thiếu đối với sự phát triển của mô – tế bào (Lê Trần Bình et al., 1997).

Nguồn cacbon

Phần lớn mô và tế bào thực vật nuôi cấy in vitro sống theo phương thức dị dưỡng vì vậy việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn cacbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn cacbon thông dụng hiện nay là sucrose. Nồng độ thích hợp là 2-3% song cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi cấy mà thay đổi. Ngoài ra còn có thể sử dụng một số nguồn cacbon khác như glucose, maltose, fructose... Các loại rượu như glycerin cũng được tế bào sử dụng. Manitol hoặc sorbitol còn có thể được sử dụng trong nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy protoplast với chức năng là chất ổn định áp suất thẩm thấu (Lê Trần Bình et al., 1997).

Vitamin

Mặc dù tất cả các loại mô và tế bào thực vật nuôi cấy in vitro có khả năng tự tổng hợp được hầu hết các loại vitamin, nhưng thường không đủ về lượng, do đó phải bổ sung thêm từ bên ngoài vào, đặc biệt là các vitamin thuộc nhóm B như: B1, B3, B5, B6, meso-inosit... rất cần thiết cho các phản ứng sinh hóa

Ø Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Trong môi trường nuôi cấy mô – tế bào thực vật thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy là các chất điều khiển sinh trưởng, thuộc các nhóm sau:

- Auxin (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000)

Có 4 loại auxin thường được sử dụng là: Indole acetic acid (IAA), Naphthylacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid (2,4-D), Indol butyric acid (IBA). Chúng chủ yếu có tác dụng kích thích sinh trưởng của tế bào nhưng cũng làm phân bào.

- Cytokinin

Là nhóm các phytohormone dẫn xuất của adenin. Cytokinin liên quan chặt chẽ với phân bào, duy trì sự trẻ hóa của các cơ quan, làm giảm hiện tượng ưu thế ngọn, kích thích sự phân hóa chồi từ mô sẹo nuôi cấy. Các loại cytokinin thường dùng trong môi trường nuôi cấy là kinetin, 6-Benzylaminopurin (BAP). Ngoài ra còn có Zeatin nhưng nó ít được sử dụng trong nuôi cấy vì giá thành quá đắt (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000).

- Gibberellic acid

Tới nay đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid. Loại thông dụng nhất trong nuôi cấy mô là GA3. Trong cơ thể thực vật, gibberellin đóng vai trò quan trọng đối với nhiều quá trình sinh lý như: Sinh lí ngủ nghỉ của hạt và chồi, phát triển của hoa, làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật.

- Abscisic acid

Abscisic acid (ABA) thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng. ABA có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi, vì vậy ABA được đưa vào môi trường tái sinh cây và mang lại hiệu quả nhất định (Dương Tấn Nhựt, 2011; Vũ Văn Vụ, 2001).

Các hỗn hợp chất tự nhiên

Sự bổ sung thêm một số các hỗn hợp dinh dưỡng tự nhiên như: nước dừa, dịch chiết mầm lúa mì, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein... vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng cường sự sinh

trưởng và phát triển của mô nuôi cấy.

Chất độn- thạch (Agar)

Agar là thành phần quyết định trạng thái vật lí của môi trường. Hàm lượng agar dùng trong nuôi cấy dao động 0,6 – 1,0 % theo khối lượng. Tuy nhiên còn tùy thuộc vào từng đối tượng nuôi cấy mà sử dụng cho phù hợp (Lê Trần Bình et al., 1997; Lê Trần Bình, Quyền Đình Thi, 2009).

Nước

Nước là thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy. Nước pha môi trường nuôi cấy thường là loại nước cất 2 lần (Lê Trần Bình, Quyền Đình Thi, 2009).

Độ pH của môi trường

Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Độ pH môi trường thường được điều chỉnh từ 5,5 – 6,0 trước khi khử trùng. Nhìn chung nếu độ pH cao hơn 6,0 sẽ làm môi trường bị cứng và nếu thấp hơn 5,0 thì agar khó đông (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000; Vũ Văn Vụ, 2001).

1.2.3.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ

Yêu cầu về nhiệt độ cho sinh trưởng và phát triển ở các loài là không như nhau. Tuy nhiên trong thực tế phòng thí nghiệm nhiệt độ thường được duy trì trong khoảng từ 25 – 28°C (Vũ Văn Vụ, 2001).

Ánh sáng

Ánh sáng có ảnh hưởng mạnh tới quá trình phát sinh hình thái của mô nuôi cấy, bao gồm cường độ, chu kì và thành phần quang phổ ánh sáng. Cường độ ánh sáng được dùng phổ biến cho nuôi cấy nhiều loại mô là từ 1000-2500 lux. Với cường độ ánh sáng lớn hơn thì sinh trưởng của chồi chậm lại nhưng sẽ thúc đẩy quá trình tạo rễ. Sự thu nhận ánh sáng của chồi in vitro phụ thuộc vào bước sóng ánh sáng và chất lượng bình nuôi cấy (Vũ Văn Vụ, 2001).

1.3. Phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

Chuyển gen bằng thông qua *Agrobacterium* là phương pháp chuyển gen gián tiếp hữu hiệu đầu tiên dùng để chuyển gen ở thực vật. Phương pháp này dùng Ti - plasmid của *Agrobacterium tumefaciens* làm vectơ đưa ADN vào tế bào. Đây là phương pháp chuyển gen tỏ ra có hiệu quả hơn hẳn các phương pháp chuyển gen trực tiếp và gián tiếp khác do dễ sử dụng, ít tốn kém, hiệu quả chuyển gen cao mà số lượng bản copy đi vào hệ gen ít, thường chỉ có một bản sao tạo thuận lợi cho việc phân tích cây chuyển gen và không gây tổn thương tế bào (Anwar et al., 2011; Trần Quốc Dung et al., 2006).

Mặc dù hệ thống chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* là có hiệu quả đối với một số loài nhưng không phải tất cả thực vật có thể được biến nạp bằng con đường này. Đặc biệt, lớp một lá

mầm bao gồm các cây ngũ cốc chính trên thế giới như lúa, lúa mì và ngô là không được biến nạp dễ dàng nhờ *A.tumefaciens*. Phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium* thường được dùng cho các loại cây hai lá mầm vì *Agrobacterium* mẫn cảm với những loại cây này (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

1.3.1. Cơ sở khoa học của phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*

Chủng *A. tumefaciens* được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật. Theo cơ chế tự nhiên, loài này có khả năng xâm nhiễm qua vết thương của hầu hết các loài thực vật hai lá mầm và một số ít các loài thực vật một lá mầm, kết quả là gây ra những khối u hay hình thành lông tơ ở rễ. Về sau, người ta xác định được rằng trong tế bào của các dạng hoang dại *A. tumefaciens* có chứa một loại plasmid đặc biệt gọi là Ti - plasmid (Tumor - inducing plasmid) chứa một đoạn DNA (Transferred - DNA) có thể chuyển sang tế bào chủ theo cơ chế tự nhiên. Do đó, *Agrobacterium* là một hệ thống chuyển gen tự nhiên (Lê Trần Bình 2008; Trần Quốc Dung et al., 2006).

Các Ti plasmid của *Agrobacterium* là các phân tử ADN sợi kép, mạch vòng có kích thước khoảng 200 kb gồm bốn vùng A, B, C, D. Vùng A hay còn gọi là T- ADN (transferred ADN) có kích thước từ 10 kb đến 20 kb, luôn được chuyển sang tế bào thực vật. Nó có chứa hai hệ gen: (1) Hệ gen gây khối u onc (oncogenic), nó chứa ít nhất ba gen chịu trách nhiệm tổng hợp các phytohormon là auxin (*iaaM*, *iaaH*) và cytokinin (*iptz*), cảm ứng sự phân chia tế bào liên tục tạo mô sẹo (khối u) của các tế bào bị nhiễm cũng như ảnh hưởng sang các tế bào lân cận; (2) Hệ gen mã hoá cho các enzyme điều khiển sự sinh tổng hợp các axit amin gọi là opine. Hai loại enzyme được nghiên cứu kỹ nhất là octopine synthase và nopaline synthase (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

Vùng D là vùng độc (virulence region) chứa các gen vir, giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển T - ADN vào hệ gen của tế bào thực vật. Nó lớn khoảng 40 kb và bao gồm 6 operon (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G*). Các gen vir trong *Agrobacterium* được khởi động nhờ các chất hoá học do các tế bào thực vật bị thương tổn tiết ra. Hoạt động của vùng vir đóng vai trò lớn trong việc chuyển T- ADN sang tế bào thực vật. Sau sự hoạt hoá các gen vir, nhân tố T-ADN sẽ được cắt khỏi plasmid.

LB và RB là các yếu tố cần thiết định hướng cho sự chuyển ADN và liên quan đến sự cắt T- ADN khỏi plasmid. Các nghiên cứu cho thấy khi cắt bỏ 25 bp bên trái vùng lặp lại thì ít ảnh hưởng đến khả năng gây u nhưng khi cắt bỏ vùng bên thì sự hình thành khối u bị ảnh hưởng. Khi đoạn cắt hạn chế chứa vùng biên phải hoặc đoạn 25 bp lặp lại được gắn lại vào vùng biên phải thì sự hình thành khối u được khôi phục. Ngoài ra nếu đoạn 25 bp được gắn ngược so với chiều tự nhiên của Ti plasmid thì hiệu quả chuyển nạp bị giảm đi rất nhiều. Các kết quả này cho thấy T- ADN được chuyển theo chiều từ phải sang trái và được xác định bởi chiều dài của vùng lặp lại.

Để chuyển nạp các gen ngoại lai vào tế bào thực vật bằng *Agrobacterium tumefaciens* cần phải có hệ thống các vectơ hữu hiệu. Hiện có hai hệ thống vectơ được phát triển đó là hệ thống vectơ liên hợp (co-integration) và hệ thống vectơ nhị thể (binary). Về nguyên tắc người ta loại bỏ vùng T-ADN gây khối u và thay thế vào đó là các gen trội chỉ thị chọn lọc - thường là các gen kháng kháng sinh hoặc các gen kháng chất diệt cỏ, cuối cùng là gắn đoạn gen cần biến nạp cùng với đoạn điều khiển phù hợp (promoter). Những phát hiện này có ý nghĩa rất quan trọng cho sự ra đời của phương pháp chuyển gen vào thực vật nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* (Nguyễn Đức Thành, 2003; Ziemienowicz, 2001).

Hình 1.4. Phương pháp chuyển gen thông qua *A. Tumefaciens*

1.3.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen nhờ *Agrobacterium*

Hệ thống nuôi cấy

Xây dựng một hệ thống nuôi cấy và tái sinh cây hoàn chỉnh là tiền đề quan trọng cho thí nghiệm chuyển gen. Đối với mỗi loài thực vật, nhất thiết phải nghiên cứu tối ưu kỹ thuật nuôi cấy thích hợp. Sau đây là những hệ thống nuôi cấy đã được sử dụng (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2000) :

Nuôi cấy mô sẹo: Mô sẹo là khối các tế bào mô mềm có mức độ cấu trúc di truyền thấp, chưa phân hóa, phân chia một cách hỗn loạn và có tính biến động di truyền cao. Mô sẹo thu được bằng nuôi cấy in vitro từ các phần non của các cơ quan của thực vật như thân, rễ, lá, hoa. trong môi trường chứa chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Mô sẹo có thể được duy trì liên tục trên môi trường nuôi cấy bằng cách cấy chuyển định kì.

Nuôi cấy tế bào huyền phù: Nuôi cấy tế bào huyền phù là kĩ thuật nuôi cấy tế bào đơn hoặc cụm nhỏ tế bào trong môi trường lỏng. Các tế bào này cũng được tạo ra từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân, rễ, lá, hoa, phôi... Tuy nhiên trở ngại lớn nhất của phương pháp này cần thời gian nuôi cấy dài và ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng tái sinh cây.

Nuôi cấy tế bào trần: Tế bào thực vật bị phá bỏ toàn bộ lớp vỏ bao bọc chỉ còn lại khối nguyên sinh chất được bao bọc bởi màng nguyên sinh được gọi là tế bào trần. Các tế bào trần sau khi được nuôi cấy trên môi trường thích hợp thì tái tạo thành tế bào, phát triển thành khối mô sẹo và hình thành cây hoàn chỉnh. Ứng dụng có ý nghĩa nhất ở phương pháp này là tạo cây soma, tạo cây lai tế bào chất thông qua dung hợp protoplast và ứng dụng để biến nạp gen.

Các yếu tố ảnh hưởng khác

Phổ vật chủ của *Agrobacterium* đã được xác định là rất rộng song hiệu quả biến nạp gen lại không giống nhau ở các cây chủ khác nhau. Ở cây hai lá mầm có tần suất chuyển nạp gen cao hơn nhiều so với cây một lá mầm (Lê Trần Bình et al., 1997; Nguyễn Đức Thành, 2003).

Hiệu quả biến nạp gen thông qua *Agrobacterium* ở thực vật phụ thuộc vào một số yếu tố như tiền xử lý mô thực vật, nguồn vật liệu gây nhiễm, nồng độ vi khuẩn, thời gian nuôi nhiễm và đặc biệt là khả năng tái sinh của thực vật sau biến nạp. Vì vậy, trong thí nghiệm chuyển gen, việc đầu tiên là tìm vật liệu thích hợp và nghiên cứu xây dựng hệ thống nuôi cấy tối ưu để nâng cao hệ số tái sinh cây lên cao nhất.

Qua nghiên cứu xây dựng hệ thống nuôi cấy tối ưu và tìm nguyên liệu thích hợp Prakash và Varadarajan đã phát hiện mô sẹo từ mảnh lá và cuống lá là vật liệu phù hợp nhất để chuyển gen thông qua *Agrobacterium* so với các loại mô khác như thân, đỉnh sinh trưởng, đầu rễ (Prakash, Varadarajan, 1992).

1.4. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô và chuyển gen ở khoai lang

1.4.1. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy mô và tái sinh cây khoai lang

Nhiều nghiên cứu cho thấy khoai lang là một trong những đối tượng rất khó xây dựng hệ thống tái sinh cây in vitro và chuyển gen. Trong nhiều năm qua đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới tập trung vào việc tìm ra môi trường nuôi cấy cũng như phương thức tái sinh phù hợp ở các giống khoai lang khác nhau.

Theo các kết quả nghiên cứu đã công bố, môi trường nuôi cấy mô khoai lang được sử dụng phổ biến là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962), có bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau như 2,4-D, kinetin, BAP... Một số tác giả đã sử dụng công thức môi trường nuôi cấy mô

khoai lang gồm 2 giai đoạn: Giai đoạn đầu nuôi cấy bổ sung auxin, giai đoạn 2 bổ sung cytokinin là zeatin hoặc TDZ cho hiệu quả tái sinh tốt (Dessai et al., 1995; Gosukonda et al., 1995). Theo Dessai và đồng tác giả (1995), các mảnh lá của khoai lang được cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D 0,2 mg/l trong 3 ngày sau đó được chuyển sang môi trường bổ sung riboside zeatin 0,2 mg/l cho hiệu quả tái sinh tốt ở kiểu gen PI 318846 – 3 (Dessai et al., 1995). Gosukonda và đồng tác giả (1995) thu được tỉ lệ tái sinh chồi đạt 78,25% trong vòng 28 ngày trên môi trường bổ sung thidiazuron 0,2 mg/l. Sử dụng riboside zeatin, và kinetin cho kết quả tần số tái sinh thấp ở kiểu gen nghiên cứu. Mẫu cấy từ lá ngọn cho tần số tái sinh cao hơn so với những mẫu lấy từ các phần cơ bản khác của chồi. Mảnh mô lá cho tần số tái sinh thấp hơn so với cuống lá. Các cây khoai lang tái sinh bằng cách sử dụng thidiazuron lớn mạnh và tạo rễ dễ dàng khi chuyển ra nhà kính (Gosukonda et al., 1995).

Phương thức tái sinh cây in vitro có thể thông qua sự phát sinh cơ quan từ mảnh lá (Dessai et al., 1995; El Abidine Triqui et al., 2008; Gosukonda et al., 1995) và cuống lá, đốt thân (Belarmino et al., 1994; Gosukonda et al., 1995), thông qua đa chồi từ mô sẹo (Anwar et al., 2011), phát sinh phôi soma từ mảnh lá, cuống lá (Zheng et al., 1996), hoặc từ tế bào nuôi cấy huyền phù gen (Xing et al., 2008 ; Yang et al., 2011; Yu et al., 2007) đã được phát triển và ứng dụng tạo cây khoai lang chuyển gen.

García đã nghiên cứu ảnh hưởng của 151 tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng đến hiệu quả tái sinh cây và chuyển gen của giống khoai lang Jewel bao gồm IAA (0 - 2,0 mg/l), NAA (0,1 - 2,0 mg/l), zeatin riboside (0,11-1,0 mg/l), kinetin (0,1- 2,0 mg/l), BAP (0,25 - 3,0 mg), paclobutanol từ 0,1- 2,0 mg/l (García et al., 2000). Cây khoai lang Jewel chuyển gen ổn định thu được sau 6 đến 10 tuần sau khi nhiễm với *A. tumefaciens* EHA105 và tái sinh cơ quan từ mô sẹo của cuống lá. Tần số chuyển gen thu được trên môi trường tái sinh bổ sung 4FA (flourophenoxyacetic acid) là 20%, môi trường tái sinh bổ sung zeatin là 10%, môi trường bổ sung IAA là 4%. Điều này cho thấy, bổ sung tỷ lệ auxin/cytokinin phù hợp có thể cải thiện sự tái sinh của mô sẹo chuyển gen (Luo et al., 2006).

Theo Gonzalez và đồng tác giả (2008), môi trường phù hợp cho tái sinh cây khoai lang Jewel CE và MSA 78354 chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* là môi trường MS có bổ sung IAA 0,5 mg/l sau bốn tuần nuôi cấy (RF = 2,02), môi trường phù hợp cho tái sinh giống khoai lang CEMSA78354 là MS bổ sung paclobutazol và 1,0 mg/l NAA (RF = 0,98) (Gonzalez et al., 2008).

1.4.2. Tình hình nghiên cứu chuyển gen khoai lang

Những kết quả nghiên cứu về tối ưu quy trình nuôi cấy mô khoai lang chính là tiền đề để ứng dụng công nghệ chuyển gen vào khoai lang. Trong một vài năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã có nhiều nỗ lực để tối ưu hóa quy trình tái sinh và tạo cây khoai lang chuyển gen. Nhiều phương pháp chuyển gen đã được nghiên cứu sử dụng ở cây khoai lang như phương pháp chuyển gen nhờ xung điện (Dhir et al., 1998; Lawton et al., 2000; Mitchell et al., 1998a; Okada et al., 2001), dùng súng bắn gen (Prakash, Varadarajan, 1992; Yi et al., 2007), chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* (Otani et al., 1993) , Tuy nhiên, những phương pháp này được xem là không hiệu quả vì sự xuất hiện thường xuyên của những biến dị, chuyển gen mà không tái sinh, năng suất hoặc hiệu quả thấp và phụ thuộc kiểu gen (Lowe et al., 1994).

Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* đã được sử dụng trong nhiều loài thực vật vì tính hiệu quả, đơn giản và ổn định của nó (Hansen et al., 1997; Joshi, Joshi, 1991; Yu et al., 2007). Chuyển gen ở khoai lang sử dụng *A. tumefaciens* đã được thực hiện từ nhiều loại mô cấy khác nhau (Cipriani et al., 1999; Gama et al., 1996; Kimura et al., 2001; Luo et al., 2006; Mitchell et al.,

1998b; Mora ́n et al., 1998; Newell et al., 1995; Otani et al., 1998; Otani et al., 2001,;2003; Shimada et al., 2006; Song et al., 2004; Wakita et al., 2001; Xing et al., 2008 ; Yu et al., 2007). Tuy nhiên, hầu hết các kết quả thu được tần số chuyển gen còn thấp và phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và chỉ thành công trên một vài giống nhất định.

Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới tiến hành nghiên cứu chuyển gen vào khoai lang với nhiều nhóm gen khác nhau, trong đó tập trung chủ yếu vào hướng tạo các dòng khoai lang chuyển gen kháng sâu và côn trùng (Mora ́n et al., 1998; Newell et al., 1995), tạo cây khoai lang kháng thuốc diệt cỏ (Anwar et al., 2011; Choi et al., 2007; Maria et al., 2009; Yi et al., 2007; Zang et al., 2009) và kháng virus (Okada et al., 2001), các dòng khoai lang cải thiện chất lượng dinh dưỡng (López et al. 1996; Wakita et al. 2001), tăng hàm lượng tinh bột (Shimada et al., 2006), chuyển gen làm tăng khả năng chống chịu stress phi sinh học (Lim et al., 2007).

Yi và đồng tác giả (2007) đã tạo được cây khoai lang mang gen bar kháng thuốc diệt cỏ bằng phương pháp bắn gen vào callus phát sinh phôi bắt nguồn từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Yi et al., 2007). Zang và đồng tác giả (2009) cũng đã tạo được cây khoai lang chuyển gen bar nhờ chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 thông qua nuôi cấy huyền phù phát sinh phôi. Khi phân tích sự có mặt của gen GUS và thực hiện phản ứng PCR thu được tần số chuyển gen cao 86,5 % cây chuyển gen, số bản copy là từ 1 đến 3 (Zang et al., 2009). Tuy nhiên, ở đây các tác giả chưa đánh giá được tính kháng thuốc diệt cỏ của các dòng cây chuyển gen.

Yu và đồng tác giả (2007) đã chuyển gen ở giống khoai lang *Ipomoea batatas* L. cv. Lizixiang bằng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 và tiến hành nuôi cấy huyền phù. Kết quả thu được 90,37 % cây chuyển gen, số bản copy của T-ADN là từ 1 đến 4, 100% cây chuyển gen sống sót khi trồng trong nhà kính và khi đưa ra ngoài đồng ruộng, không quan sát thấy có sự biến dị về hình thái của các cây *ex vitro* (Yu et al., 2007).

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây cũng đã có một số viện nghiên cứu đầu ngành như Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam thực hiện các đề tài, các dự án nghiên cứu trên đối tượng khoai lang và cũng đã thu được một số kết quả bước đầu.

Viện Công nghệ Sinh học đã thực hiện một số đề tài như: Phân lập gen và tạo cây khoai lang chuyển gen kháng bọt hà (Hợp tác ISAAA, từ 1997 đến nay). Đề tài "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống kháng sâu bệnh và có chất lượng cao ở cây khoai lang (2003)", đề tài nhánh trong đề tài KC-04-22: "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống kháng sâu bệnh và có chất lượng cao ở một số cây có củ" do Viện Di truyền Nông nghiệp chủ trì. Một số kết quả nổi bật của đề tài là đã phân lập và thiết kế gen diệt bọt hà ở khoai lang, đã chuyển gen và đánh giá cây chuyển gen ở phòng thí nghiệm và nhà lưới, hoàn thiện quy trình tái sinh cây chuyển gen và áp dụng thử nghiệm. Những kết quả này phục vụ tốt cho các nghiên cứu về chuyển gen thực vật nói chung và đặc biệt là chuyển gen ở khoai lang.

Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật vào nghiên cứu tạo giống sạch bệnh và tạo giống khoai lang mới bằng chuyển gen sẽ tạo ra triển vọng mới trong việc tăng năng suất cũng như diện tích khoai lang tại Việt Nam. Đã có một số nghiên cứu về sự tái sinh *in vitro* và chuyển gen của một số giống khoai lang Việt Nam (Phạm Bích Ngọc et al., 2002) nhưng kết quả thu được còn hạn chế, đặc biệt là chưa tập trung hoàn thiện hệ thống tái sinh của các giống khoai lang địa phương có năng suất và chất lượng tốt.

1.5. Phương pháp sàng lọc và đánh giá cây chuyển gen

1.5.1 Sàng lọc cây chuyển gen bằng chất chọn lọc

Sàng lọc sau khi chuyển gen bằng chất chọn lọc đặc hiệu được xem là bước đi đầu tiên và đặc biệt quan trọng để xác định được tế bào mang gen chuyển đồng thời giúp làm giảm được công sức cho các phân tích tiếp theo. Muốn vậy cần thiết phải lập được môi trường chọn lọc thích hợp nhằm loại bỏ các tế bào không mang gen chuyển, đồng thời giữ lại được hầu hết các tế bào có mang gen chuyển [15].

Để chọn lọc các tế bào mang gen biến nạp, trong vector biến nạp thường phải chứa các gen chọn lọc như: nptII – kháng kanamycine, hyg – kháng hygromycin, str/spc – kháng streptomycin và spectinomycin, bar – kháng thuốc trừ cỏ PPT (phosphinothricin)... Các loại vector này đã được ứng dụng và mang lại thành công trong việc chọn lọc các tế bào mang gen chuyển ở nhiều đối tượng cây trồng như cây bông vải, cây hồng, cây thuốc lá, lúa... [3], [13], [21], [26].

Hiện nay, với mục tiêu an toàn sinh học, an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường, người ta đã đưa vào vector chuyển gen các gen chỉ thị chọn lọc ít độc hơn như pmi mã hóa cho enzyme phosphomannose isomerase, hệ thống chọn lọc sử dụng đường mannose. Hệ thống chọn lọc này đã mang lại thành công trên các đối tượng như táo, cam quýt, lúa ... [28], [30], [37], [50]. Tuy nhiên đến nay trên đối tượng cây thông vẫn chưa có kết quả nào được công bố.

Để sử dụng được các chất chọn lọc như kháng sinh, thuốc diệt cỏ hay đường trong hệ thống chọn lọc tế bào chuyển gen cần xác định được ngưỡng nồng độ chọn lọc thích hợp với từng loại tế bào, mô hay loài cây. Các thí nghiệm này cần tiến hành trước khi thực hiện chuyển gen vào một đối tượng cây trồng nào đó. Theo Brukhin và cộng sự [33], để công tác chọn lọc có hiệu quả đồng thời không tiêu diệt cả các tế bào mang gen chuyển thì môi trường chọn lọc cần thiết lập một ngưỡng nồng độ thấp nhất có thể loại bỏ được khoảng 90% các cá thể không mang gen chuyển.

1.5.2. Phân tích cây chuyển gen gus bằng nhuộm hoá mô tế bào

Hệ thống dung hợp gen gus (*Escherichia coli* - - D - glucuronidase gene) được khám phá bởi Jefferson [49]. Nó được xem như một công cụ hữu hiệu trong việc đánh giá hoạt động của gen trong cây chuyển gen và được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực biến nạp gen ở thực vật [15].

Gen gus (*uidA*) là một gen chỉ thị lý tưởng với những đặc điểm sau: Sản phẩm của nó là độc nhất và không độc với tế bào vật chủ, các enzyme chỉ thị của nó có tính ổn định cao, các phương pháp phân tích sản phẩm của gen này đơn giản, thuận tiện, rẻ tiền, nhạy và đặc thù, có khả năng kết hợp với các polypeptide bên ngoài mà vẫn giữ được hoạt tính enzyme.

Cơ chế biểu hiện của gen gus: gen gus mã hóa cho enzyme -glucuronidase. Enzyme này là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải cơ chất X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide), sản phẩm phân giải có màu xanh đặc trưng dễ nhận biết và rất bền vững. Trong tự nhiên -glucuronidase không tồn tại trong thực vật, vì vậy gen gus là gen chỉ thị rất hữu hiệu trong kỹ thuật chuyển gen ở thực vật [50].

Để thuận lợi hơn cho việc sử dụng gen chỉ thị gus ở thực vật, người ta tiến hành thiết kế vùng cấu trúc intron (vùng không phiên mã) có chứa *uidA*. Do vậy, trong các bước biểu hiện gen gus tạm thời ở mô thực vật tránh được hiện tượng dương tính giả. Khi còn ở trong vi khuẩn *Agrobacterium*, gen gus nằm trong vùng intron của vector chuyển gen nên không được phiên mã, dịch mã để tạo sản phẩm enzyme và không có phản ứng tạo màu đặc trưng khi nhuộm trong cơ chất X-Gluc. Chỉ khi được chuyển vào tế bào thực vật, thông qua bộ máy di truyền của tế bào thực vật gen gus mới được phiên mã, dịch mã để tạo ra sản phẩm tham gia vào phân giải cơ chất và

tạo phản ứng màu đặc trưng. Hệ thống dung hợp gen gus (*Escherichia coli* - - D - glucuronidase gene) được khám phá bởi Jefferson [49]. Nó được xem như một công cụ hữu hiệu trong việc đánh giá hoạt động của gen trong cây chuyển gen và được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực biến nạp gen ở thực vật [15].

Gen gus (*uidA*) là một gen chỉ thị lý tưởng với những đặc điểm sau: Sản phẩm của nó là độc nhất và không độc với tế bào vật chủ, các enzyme chỉ thị của nó có tính ổn định cao, các phương pháp phân tích sản phẩm của gen này đơn giản, thuận tiện, rẻ tiền, nhạy và đặc thù, có khả năng kết hợp với các polypeptide bên ngoài mà vẫn giữ được hoạt tính enzyme.

Cơ chế biểu hiện của gen gus: gen gus mã hóa cho enzyme -glucuronidase. Enzyme này là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải cơ chất X-Gluc (5-bromo-4- chloro-3-indolyl glucuronide), sản phẩm phân giải có màu xanh đặc trưng dễ nhận biết và rất bền vững. Trong tự nhiên - glucuronidase không tồn tại trong thực vật, vì vậy gen gus là gen chỉ thị rất hữu hiệu trong kỹ thuật chuyển gen ở thực vật [50].

Để thuận lợi hơn cho việc sử dụng gen chỉ thị gus ở thực vật, người ta tiến hành thiết kế vùng cấu trúc intron (vùng không phiên mã) có chứa *uidA*. Do vậy, trong các bước biểu hiện gen gus tạm thời ở mô thực vật tránh được hiện tượng dương tính giả. Khi còn ở trong vi khuẩn *Agrobacterium*, gen gus nằm trong vùng intron của vector chuyển gen nên không được phiên mã, dịch mã để tạo sản phẩm enzyme và không có phản ứng tạo màu đặc trưng khi nhuộm trong cơ chất X-Gluc. Chỉ khi được chuyển vào tế bào thực vật, thông qua bộ máy di truyền của tế bào thực vật gen gus mới được phiên mã, dịch mã để tạo ra sản phẩm tham gia vào phân giải cơ chất và tạo phản ứng màu đặc trưng.

MỤC TIÊU

- Xây dựng hệ thống nuôi cấy mô và tái sinh cây in vitro thích hợp cho giống khoai lang nghiên cứu.
- Xây dựng quy trình chuyển gen ở khoai lang thông qua chuyển gen GUS sử dụng phương pháp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

NỘI DUNG

- 1) Nghiên cứu khả năng tái sinh cây trực tiếp.
- 2) Nghiên cứu khả năng tái sinh cây thông qua đa chồi từ mô sẹo.
- 3) Xây dựng quy trình chuyển gen thông qua chuyển gen GUS bằng phương pháp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Ø Phương pháp tạo đa chồi trực tiếp:

-Sử dụng các nguyên liệu khác nhau như cuống lá, mảnh lá, lát cắt thân nuôi cấy trên môi trường khác nhau để tái sinh chồi. Chồi được hình thành trực tiếp từ các nguyên liệu nuôi cấy.

Ø Phương pháp tái sinh đa chồi từ mô sẹo

- Phương pháp nuôi cấy mô sẹo: các phần non của cây khoai lang in vitro như mảnh lá, cuống lá, đỉnh ngọn được nuôi cấy trên môi trường bổ sung các loại auxin khác nhau với nồng độ khác

nhau để cảm ứng mô sẹo.

- Phương pháp tái sinh cây qua mô sẹo: Mô sẹo được nuôi cấy trên các môi trường khác nhau để cảm ứng sự tái sinh chồi.

Ø Phương pháp nhân nhanh chồi: Chồi sau khi tái sinh in vitro được đưa vào nuôi cấy trong môi trường phù hợp để tái sinh đa chồi nhằm mục đích tăng hệ số nhân chồi.

2.3.2. Phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

- Nuôi dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*:

Cấy trái *A. tumefaciens* C58 cắt giữ glycerol lên đĩa môi trường LB đặc bổ sung kanamycin 50 mg/l, rifamycin 50 mg/l, chloramphenicol 50 mg/l, nuôi ở 28 °C trong 48 - 96 giờ. Sau đó lấy một khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng (bổ sung kháng sinh phù hợp) ở 28 °C, lắc ở tốc độ 220 vòng/phút trong 16-18 giờ. Dịch vi khuẩn được nuôi hoạt hóa trên môi trường LB lỏng không có kháng sinh ở 28 °C, lắc 220 vòng/phút trong từ 3 - 5 giờ cho tới OD₆₀₀ = 0,8 - 1,0. Dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút, ở 4 °C trong 10 phút để thu cặn tế bào và hòa tan trong môi trường 1/2 MS và pha loãng cho tới OD₆₀₀ phù hợp.

- Phân tích sự biểu hiện tạm thời của gen *gus*: Theo phương pháp của Jefferson và đồng tác giả (Jefferson et al., 1987):

Mẫu biến nạp sau thời gian đồng nuôi cấy được thu ngẫu nhiên mỗi đĩa 10 - 20 mẫu, đem nhuộm với dung dịch X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide), để 8-12 giờ trong tối ở nhiệt độ 37 °C. Sau đó rửa bằng cồn 70% ba lần và quan sát dưới kính hiển vi. Những vùng biểu hiện gen *gus* có màu xanh chàm hay xanh lam (gọi là mẫu dương tính). Hiệu quả chuyển gen được tính là tỉ lệ phần trăm mẫu biểu hiện dương tính khi nhuộm *gus*

Ø Quy trình chuyển gen:

+ Cắt nguyên liệu thành các mẫu có kích thước khoảng 0,3 cm (đối với đỉnh sinh trưởng), 0,3 x 0,3 cm (đối với mảnh lá)

+ Nguyên liệu đã cắt nhỏ được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* đã chuẩn bị trong khoảng thời gian 20 - 30 phút.

+ Mẫu đã nhiễm khuẩn cấy lên môi trường đồng nuôi cấy trong khoảng 2 - 3 ngày và để trong tối.

+ Rửa khuẩn và chuyển mẫu lên môi trường chọn lọc mô sẹo.

+ Các mô sẹo sống sót trên môi trường chọn lọc, cấy chuyển lên môi trường tái sinh là môi trường MS bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng phù hợp để tái sinh chồi.

+ Chồi tái sinh được chọn lọc trên môi trường ra rễ MS bổ sung 100 mg/l kanamycin.

2.3.3. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Ø Môi trường nuôi cấy

- Môi trường tạo mô sẹo là môi trường CP bổ sung 20 g/l sucrose, 8 g/l agar. Môi trường tạo phôi là môi trường EP bổ sung 2% sucrose, 2,5 g/l gelrite, 50 mg/l vitamin C.

- Môi trường nhân chồi và tái sinh cây là môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8

g/l agar. Ngoài ra, các môi trường còn bổ sung thêm các chất kích thích sinh trưởng khác nhau.

- Giá trị pH của môi trường nuôi cấy là 5,8. Môi trường được khử trùng ở 1170C, trong khoảng thời gian từ 15- 25 phút.

Ø Điều kiện nuôi cấy:

- Nhiệt độ phòng nuôi cấy: 25- 280C

- Ánh sáng: Sử dụng hệ thống giàn đèn cung cấp ánh sáng huỳnh quang với cường độ ánh sáng từ 2000 - 3000 lux. Thời gian chiếu sáng 12- 14 h/ngày.

HIỆU QUẢ KTXH

1. Kết quả nghiên cứu thu được của đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, cụ thể là:

- Kết quả nghiên cứu về xây dựng và hoàn thiện hệ thống nuôi cấy mô tế bào và tái sinh ở giống khoai lang KB1 thông qua tái sinh chồi trực tiếp và tái sinh chồi từ mô sẹo sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu tái sinh ở các giống khoai lang địa phương khác của Việt Nam, đồng thời đây sẽ là tài liệu tham khảo chuyên ngành công nghệ tế bào thực vật bổ ích cho sinh viên, giáo viên tại các trường cao đẳng, đại học quan tâm và nghiên cứu về lĩnh vực này.

- Kết quả về xây dựng và hoàn thiện quy trình chuyển gen ở khoai lang giống KB1 sẽ cơ sở để xây dựng quy trình chuyển gen ở các giống khoai lang khác và là tiền đề tốt cho các nghiên cứu về chuyển gen Bt vào khoai lang để tạo cây khoai lang kháng bọ hà ở Việt Nam. Đây là hướng nghiên cứu có tính ứng dụng thực tiễn cao.

2. Hiệu quả đạt được của đề tài

- Về giáo dục, đào tạo: Báo cáo tổng kết của đề tài sẽ được lưu giữ tại Phòng Công nghệ thông tin và thư viện - trường Đại học Khoa học và Trung tâm học liệu - Đại học Thái Nguyên là tài liệu tham khảo và học tập tốt cho các sinh viên, giáo viên chuyên ngành Di truyền và Công nghệ tế bào, Sinh lí thực vật...

+ Đề tài là một phần kết quả quan trọng trong luận án tiến sĩ của chủ nhiệm đề tài

+ Đề tài đóng góp 04 bài báo vào hệ thống khoa học của quốc gia và 01 báo cáo tại hội nghị quốc gia về công nghệ sinh học.

+ Đề tài cũng góp phần đào tạo 03 cử nhân khoa học về sinh học và công nghệ sinh học và 02 đề tài NCKH sinh viên.

- Về kinh tế - xã hội: Các quy trình tái sinh và chuyển gen đã xây dựng sẽ được ứng dụng vào trong các nghiên cứu tiếp theo để tạo giống khoai lang kháng bọ hà góp phần vào chương trình chọn tạo giống khoai lang mới của Việt Nam.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

- Khoa Khoa học sự sống, Trường Đại học Khoa học

- Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam