

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

TỔNG QUAN

TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU THUỘC LĨNH VỰC CỦA ĐỀ TÀI Ở TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1. Ngoài nước

Khoai lang là đối tượng rất khó xây dựng hệ thống nuôi cấy, tái sinh cây in vitro và chuyển gen. Trong nhiều năm qua, đã có nhiều nghiên cứu tập trung vào việc tìm ra môi trường nuôi cấy cũng như phương thức tái sinh phù hợp nhất ở các giống khoai lang khác nhau, đặc biệt là các giống khoai lang có năng suất cao và chất lượng tốt. Theo nhiều kết quả nghiên cứu, môi trường nuôi cấy mô khoai lang sử dụng phổ biến là môi trường Murashige và Skoog (1965) và được bổ sung tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.

Một số tác giả đã sử dụng công thức môi trường nuôi cấy mô khoai lang gồm hai giai đoạn. Giai đoạn đầu nuôi cấy bổ sung auxin, giai đoạn thứ hai bổ sung cytokinin là zeatin hoặc TDZ cho hiệu quả tái sinh tốt. Theo Dessaiet al., các mảnh lá của khoai lang [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)] được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,4D 0,2mg/l trong 3 ngày và sau đó chuyển sang môi trường bổ sung riboside zeatin 0,2mg/l cho hiệu quả tái sinh tốt ở kiểu gen PI 318846-3 (Dessaiet al., 1995). Gosukondaet al. thu được tỷ lệ tái sinh chồi đạt 78,2% trong vòng 28 ngày trên môi trường giai đoạn hai bổ sung thidiazuron 0,2mg/l (Gosukondaet al., 1995).

Sự tái sinh cây khoai lang trong nuôi cấy mô và chuyển gen đã thu được từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau. Nguồn nguyên liệu đem nuôi cấy có thể là lá, cuống lá, đoạn thân, mô phân sinh và phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của chúng. Phương thức phát sinh cây của cây khoai lang in vitro rất đa dạng: cây có thể tái sinh từ protoplast (Moránet al., 1998), thông qua sự phát sinh cơ quan, từ rễ, lá và đốt thân (Luoet al., 2006). Ngoài ra, sự tạo chồi có thể được cảm ứng trực tiếp từ rễ bất định hoặc từ chồi (Zanget al., 2009). Sự phát sinh phôi soma từ các mảnh cắt như đỉnh chồi, đỉnh sinh trưởng, lá, cuống lá, thân, và rễ (Newelet al., 1995; Yiet al., 2007), từ nuôi cấy huyền phù tế bào (Yuet al., 2007; Zanget al., 2009).

Tình hình nghiên cứu chuyển gen ở khoai lang

Việc chèn một gen đơn lẻ vào khoai lang bằng phương pháp truyền thống rất phức tạp vì trạng thái lục bội tự nhiên của nó. Vì vậy, chuyển gen vào khoai lang thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens* là cách thức ưu việt nhất để tránh phải thực hiện việc lai chéo hay lai ngược tốn rất nhiều thời gian và công sức.

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 nghiên cứu chuyển gen vào cây khoai lang như nghiên cứu chuyển gen nhờ xung điện vào protoplast, chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. rhizogenes* (Otani et al., 1993), súng bắn gen (Yi et al., 2007), và nghiên cứu chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* được xem là phù hợp nhất và được sử dụng rộng rãi để chuyển gen vào khoai lang (Newel et al., 1995; Morán et al., 1998, Otaniet al., 1998; Song et al., 2004; Otani et al., 2001; Luo et al., 2006; Yu et al., 2007; Zang et al., 2009). 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.

Chuyển gen vào khoai lang tập trung chủ yếu vào hướng tạo cây khoai lang chuyển gen kháng sâu và côn trùng (Newel et al., 1995; Morán et al., 1998), kháng thuốc diệt cỏ (Yi et al.,

2000; Zang et al., 2009) và kháng virus (Okada et al., 2001), chuyển gen làm tăng hàm lượng tinh bột.

Newel et al.(1995) đã xây dựng được một quy trình chuyển gen vào giống Jewel sử dụng phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*. Morán et al. (1998) cũng đã thu được một số dòng Jewel chuyển gen CryIIIA bằng phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*. Okada et al. (2001) đã tạo được cây khoai lang chuyển gen kháng virus SPFMV bằng phương pháp chuyển gen mã hóa protein vỏ virus bằng phương pháp xung điện. Nhóm tác giả đã thu được 3 dòng cây chuyển gen và phân tích sự phiên mã, dịch mã của gen bằng các phương pháp Northern và Western và cũng đã phân tích tính kháng virus của các dòng khoai lang chuyển gen.

Yi et al. (2007) đã tạo được cây khoai lang mang gen bar kháng thuốc diệt cỏ bằng phương pháp bắn gen vào callus phát sinh phôi bất nguồn từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Zang et al. (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. Tuy nhiên, ở đây các tác giả chưa đánh giá được tính kháng thuốc diệt cỏ của các dòng cây chuyển gen.

Dessai AP; Gosukonda RM; Blay E; Dumenyo CK; Medina-Bolivar F; Prakash CS,(1995) Plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explants in vitro using a two-stage protocol. *Scientia Horticulturae*, Vol. 62: 217-224.

González RG, Sánchez DS, Campos JM, Vázquez EP, Guerra ZZ, Quesada AL, Valdivia RM, González MG (1999) Plant regeneration from leaf and stem explants from two sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) Cultivars. *Biotechnology Aplicada*; Vol. 16 (1): 11 - 14 .

Garía R, Somontes D, Zaldúa Z, Mena J, López A, Morán R, Arencibia AD, Quiroz K Caligari PDS (2008) Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) cultivars. *Asia Pacific Journal of Molecular Biotechnology*, Vol. 16(2): 25-33.

Luo HR, Santa maria M, Benavides J, Zhang DP, Zhang YZ, Ghislain M (2004) Rappid genetic transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5 (20): 1851- 1857.

Newel CA, Lowe JM, Merryweather A, Rooke LM, Hamilton WDO (1995) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) La bacterium *tumefaciens* and regeneration of plants express cow pea trypsin m) with Agro inhibitor and snowdrop. *Plant Science*, Vol.107:215-227.

Gosukonda RM, Prakash CS, Porobodessai A, Blay E, Peterson (1995) Thidiazuron - induced adventitious shoot regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas*. In vitro *Cell Dev Biol* 31: 65-71 .

Yu B, Zhai H, Wang Y, Zang N, Wang Y, Liu Q (2007) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation ussing embryogenic suspension culture in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Vol. 90: 265- 273.

Yi G, Shin YM, Choe G, Shin B, Kim YS, Kim KM (2007) Production of herbicide- resistant sweet potato plants transformed with the bar gene. *Biotechnol Lett*, Vol. 29: 669- 675.

Zang N, Zhai H, Gao S, Chen W, He S, Liu Q (2009) Efficient production of transgenic plants using the bar gene for herbicide resistance in sweetpotato. *Scientia Horticulturae*, Vol.122: 649- 653.

2. Trong nước

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 KH & CN Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam thực hiện các đề tài, 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, 2011).

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.

Đề tài “Xây dựng và hoàn thiện các qui trình chuyển gen cho các đối tượng thực vật và tạo cây trồng chuyển gen” đã xây dựng được quy trình chuyển gen vào một số cây trồng như lúa, thuốc lá, bông, đu đủ, khoai lang, cà chua, cây xoan, đậu tương, cây cam sành, quýt đường canh.

Đề tài “Phân lập các gen có giá trị kinh tế của cây trồng nông lâm nghiệp Việt Nam”. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập các promoter đặc hiệu thực vật, các gen liên quan đến tính kháng côn trùng, thiết kế vector chuyển gen thực vật. 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.

Viện Di truyền nông nghiệp đã chuyển gen kháng nấm, gen kháng bọt hà, và gen kháng virus vào khoai lang. Đã thu được 10 dòng trong đó có 2 dòng mang gen Cry1Cm, 13 dòng trong đó có 2 dòng mang gen VIP, 01 dòng khoai lang chuyển gen CP kháng virus. Các dòng khoai lang này hiện đang được trồng thử tại Trạm chuyển giao công nghệ Văn Giang, Hưng Yên.

Hiện nay, Viện Công nghệ sinh học đang tiến hành đề tài “Nghiên cứu tạo giống khoai lang kháng bọt hà bằng công nghệ gen” do GS.TS. Lê Trần Bình làm chủ nhiệm đề tài. Đây là đề tài có tính ứng dụng cao, các kết quả nghiên cứu thu được sẽ góp phần vào việc phát triển cây khoai lang kháng bọt hà của Việt Nam.

Lê Trần Bình (2008) Phát triển cây trồng chuyển gen ở Việt Nam. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

Hoàng Kim (2011) Giống khoai lang ở Việt Nam, truy nhập từ địa chỉ <http://foodcrops.blogspot.com/>.

Đình Thế Lộc (1995) Cây khoai lang. NXB Nông nghiệp.

Viện Công nghệ sinh học (2011) truy nhập từ địa chỉ:

http://www.ibt.ac.vn/index.php?option=com_content&task=view&id=392&Itemid=580

10.3. Danh mục các công trình đã công bố thuộc lĩnh vực của đề tài của chủ nhiệm và những thành viên tham gia nghiên cứu

a) Công trình của chủ nhiệm đề tài:

Vũ Thị Lan, Quách Thị Liên, Nguyễn Đức Thành, “Ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng và nước dừa đến sinh khối mô sẹo cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.)”, Tạp chí

KH&CN- ĐHTN, Tập 82, số 06, 2011, trang 65-69

Vũ Thị Lan, Phạm Thị Oanh, "Nhân giống dưa Cayen (*Ananas comosus* L.) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng", Tạp chí KH&CN- ĐHTN, tập 67 số 05 - 2010, trang 118-122.

Vũ Thị Lan, Nguyễn Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Thanh Mai, "Nuôi cấy mô sẹo để tái sinh cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.)", Tạp chí KH&CN- ĐHTN, tập 53 số 5-2009, trang 96-101.

Vũ Thị Lan, Quách Thị Liên, Nguyễn Đức Thành, "Ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều tiết sinh trưởng và casein đến sinh khối mô sẹo cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.)", Tạp chí công nghệ sinh học, tập 6, số 1, năm 2008, trang 97-106.

Nguyễn Thị Tâm, Vũ Thị Lan, Nguyễn Thành Luân "Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và giá thể đến sinh trưởng của cây lan *Dendrobium hybrid in vitro*". Tạp chí KH&CN- ĐHTN, tập 2, số 3, 2007, trang 105- 109.

Vì Thị Đoàn Chính, Nguyễn Thị Ngọc Liên, Trịnh Ngọc Hoàng, Trịnh Đình Khá, Vũ Thị Lan, "Nghiên cứu sự phân bố của xạ khuẩn sinh kháng sinh phân lập ở đất Thái Nguyên", Báo cáo hội nghị khoa học sinh học toàn quốc, 2007, trang 433- 436.

Quách Thị Liên, Vũ Thị Lan, Lê Thị Vân Anh, Nguyễn Đức Thành, "Nuôi cấy mô sẹo cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.)", Tạp chí công nghệ sinh học, tập 3, số 3, năm 2005, trang 353- 362 .

b) Công trình của những người tham gia đề tài:

Vũ Thanh sắc, Nghiên cứu nhân giống in vitro cây ban Âu (*Hypericum perforatum* L.), Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2009

Nguyễn Thanh Nhàn, Phạm Thị Minh Đức, Lê Thu Ngọc, Lê Văn Trường, Đỗ Thị Huyền, Trần Ngọc Tân, Phạm Thùy Linh, Trương Nam Hải (2010), Thiết kế plasmid tái tổ hợp từ vector biểu hiện pAC7 mang gen entP dung hợp với các phân đoạn baamylF1 và baamylF2 để tổng hợp enterocin P trong *Bacillus subtilis* 168, Tạp chí Công nghệ Sinh học 8(1): 13-20.

Nguyễn Thanh Nhàn, Lê Thu Ngọc, Đỗ Thị Huyền, Trần Ngọc Tân, Phạm Thùy Linh, Lê Văn Trường, Trương Nam Hải (2009), "Tách dòng và biểu hiện gen Enterocin P ở dạng dung hợp với CBD-SSP Intein trong *Escherichia coli* ER2566", Tạp chí Công nghệ Sinh học 7(2), tr. 27-33.

Phạm Thùy Linh, Lê Thu Ngọc, Trần Ngọc Tân, Nguyễn Thanh Nhàn, Đỗ Thị Huyền, Lê Văn Trường, Trương Nam Hải (2009), "Biểu hiện gen mã hóa cho Enterocin P của vi khuẩn *Enterococcus faecium* trong nấm men *Pichia pastoris* GS115", Hội nghị Quốc gia về Sinh vật biến đổi gen và Quản lý an toàn sinh học 2009, tr. 145-149.

MỤC TIÊU

- Xác định được một số điều kiện nuôi cấy, tái sinh cây in vitro thích hợp cho giống khoai lang nghiên cứu.
- Lựa chọn được phương thức tái sinh cây hiệu quả nhằm xây dựng được quy trình tái sinh cây khoai lang phục vụ cho chuyển gen.
- Xây dựng quy trình chuyển gen vào khoai lang bằng chuyển gen GUS thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*.

NỘI DUNG

1) Nghiên cứu khả năng tái sinh thông qua đa chồi

- Xác định loại mẫu cấy phù hợp

- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy thích hợp cho cảm ứng tạo đa chồi
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy để nhân nhanh chồi
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy phù hợp cho tạo cây hoàn chỉnh

2) Nghiên cứu khả năng tái sinh thông qua phôi soma

- Xác định loại mẫu cấy phù hợp cho tạo mô sẹo
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy thích hợp cho cảm ứng tạo mô sẹo
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy thích hợp cho tạo phôi từ mô sẹo
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy để nhân nhanh chồi
- Xác định thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy phù hợp cho tạo cây hoàn chỉnh

3) Nghiên cứu chuyển gen GUS vào giống khoai lang thông qua Agrobacterium đã xây dựng được quy trình tái sinh

- Xác định điều kiện xử lí và thời gian tiền nuôi cấy của vật liệu sử dụng cho chuyển gen
- Xác định nồng độ vi khuẩn gây nhiễm, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy phù hợp cho hiệu quả chuyển gen cao
- Xác định ngưỡng chọn lọc tối ưu để sàng lọc chồi/cây chuyển gen

4) Đánh giá hiệu quả của quy trình chuyển gen vào khoai lang

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

a) Phương pháp nuôi cây mô tế bào:

- Phương pháp khử trùng mẫu
- Phương pháp tạo mô sẹo
- Phương pháp tái sinh thông qua tạo đa chồi
- Phương pháp tái sinh thông qua phôi soma

b) Phương pháp chuyển gen thông qua A. tumefaciens

- Agrobacterium mang vector chuyển gen có gen chỉ thị GUS được nhiễm vào mảnh cấy (mảnh lá, cuống lá). Tiếp tục nuôi cộng sinh vật liệu chuyển gen với Agrobacterium trong 2-3 ngày. Sau đó, tiến hành chọn lọc cây chuyển gen trên môi trường có chứa kháng sinh
- Phương pháp nhuộm GUS (Theo phương pháp nhuộm tế bào học của Jefferson & CS, 1986)
- Chọn lọc cây chuyển gen trên môi trường chứa chất kháng sinh

Kiểm tra sự có mặt của gen GUS bằng kỹ thuật PCR

HIỆU QUẢ KTXH

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG