BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ NHÃ

TẠO DÒNG BÔNG (*Gossypium hirsutum* L.) CHỐNG CHỊU THUỐC TRỪ CỎ GLUFOSINATE VÀ GLYPHOSATE BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN QUA TRUNG GIAN *Agrobacterium tumefaciens*

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. Hồ Chí Minh – Năm 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ NHÃ

TẠO DÒNG BÔNG (*Gossypium hirsutum* L.) CHỐNG CHỊU THUỐC TRỪ CỎ GLUFOSINATE VÀ GLYPHOSATE BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN QUA TRUNG GIAN *Agrobacterium tumefaciens*

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. PHAN THANH KIẾM
TS. BÙI MINH TRÍ

TP. Hồ Chí Minh – Năm 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các số liệu, kết quả trong luận án hoàn toàn trung thực và là một phần trong đề tài "*Nghiên cứu tạo giống bông kháng sâu và chịu thuốc trừ cỏ bằng kỹ thuật chuyển gen"* mã số KC.06.11/11-15 thuộc Chương trình *"Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ phục vụ sản xuất các sản phẩm chủ lực"* do TS. Trần Thanh Hùng và TS. Trịnh Minh Hợp làm chủ nhiệm. Những số liệu trong luận án được phép công bố với sự đồng ý của Chủ nhiệm đề tài và chưa từng được sử dụng để bảo vệ học vị nào.

Tác giả của luận án

Nguyễn Thị Nhã

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian thực hiện luận án, tôi luôn nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ tận tình của tập thể Quý thầy cô, các cơ quan và cá nhân. Nhân dịp này tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS. TS. Phan Thanh Kiếm và TS. Bùi Minh Trí là những người thầy hướng dẫn khoa học đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn tôi thực hiện luận án;

Ban Giám hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, Phòng Đào tạo Sau Đại học, Bộ môn Công nghệ sinh học Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện tốt nhất và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án;

Tập thể Quý thầy cô giáo Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã hướng dẫn và giúp tôi thời gian thực hiện luận án tại Trường;

Lãnh đạo Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nha Hố, Chủ nhiệm đề tài *"Nghiên cứu tạo giống bông kháng sâu và chịu thuốc trừ cỏ bằng kỹ thuật chuyển gen"* mã số KC.06.11/11-15 đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất để thực hiện các nội dung nghiên cứu, Ban Giám hiệu Trường Đại Học Nguyễn Tất Thành đã tạo điều kiện về thời gian để tôi hoàn thành các yêu cầu của Cơ sở đào tạo;

Tất cả bạn bè và đồng nghiệp những người đã dành cho tôi sự giúp đỡ chân thành trong quá trình làm luận án;

Chồng, con cùng những người thân trong gia đình đã luôn động viên, ủng hộ và là điểm tựa tinh thần to lớn cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Nhã

TÓM TẮT

Các thí nghiệm của Luận án "Tạo dòng bông (*Gossypium hirsutum* L.) chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate và Glyphosate bằng kỹ thuật chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens.*" được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nha Hố-xã Nhơn Sơn-huyện Ninh Sơn-tỉnh Ninh Thuận, trên giống bông Coker310 và dòng Coker310FR; hai cấu trúc gen P35S-*EPSPS*-TNOS và PNOS-*bar*-TNOS; hai vector chuyển gen pCB301:*npt*II và pCAMBIA1300:*hpt*; và vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260. Thời gian thực hiện từ năm 2013 đến năm 2020. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài là ứng dụng được phương pháp chuyển gen qua trung gian *A.tumefaciens* để chuyển gen *EPSPS* và *bar* vào cây bông và tạo được dòng bông chuyển gen chống chịu cao với thuốc trừ cỏ glyphosate/glufosinate. Kết quả cho thấy:

Dòng Coker310FR chọn lọc qua tái sinh liên tục ba thế hệ của giống bông Coker310 có khả năng tái sinh rất cao, thể hiện qua tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi là 95,6% và tỷ lệ cây tái sinh không dị dạng trên môi trường GR5 là 36,7%.

Bốn vector chuyển gen, gồm pCAMBIA1300:*hpt-bar,* pCAMBIA1300:*hpt-EPSPS,* pCB301:*npt*II-*bar* và pCB301:*npt*II-*EPSPS* được tái cấu trúc bằng cách chèn vùng P35S-*EPSPS*-TNOS và PNOS-*bar*-TNOS vào vector biểu hiện thực vật pCB301:*npt*II và pCAMBIA1300:*hpt*. Kiểm tra hiện diện của 04 gen đích và gen độc lực *vir*C khẳng định 04 vector chuyển gen được biến nạp thành công vào vi khuẩn A. tumefaciens chủng C58/PGV2260.

Nhiễm mẫu thân mầm giống bông Coker310 với *A. tumefaciens* mang gen *EPSPS* và *bar* ở mật độ, thời gian lây nhiễm, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ cảm ứng, sống sót và phát sinh phôi của mô sẹo chuyển gen. Kết quả tốt nhất đạt được khi lây nhiễm vi khuẩn với mật độ OD600 0,75 trong 10 phút, đồng nuôi cấy 64 giờ ở nhiệt độ 22 ^{o}C.

Tương tác giữa loại mẫu/giống với tác nhân chọn lọc ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh và tỷ lệ cây mang gen chuyển. Hiệu quả chuyển vector pCAMBIA1300:*bar* vào mẫu lá mầm Coker310FR đạt cao nhất với 2,8% mô sẹo phát sinh phôi, 15,8 cây/mẫu được tái sinh, 76,0% số cây mang gen chuyển và 64,7% trong số đó hữu thụ. Hiệu

quả chuyển vector pCB301:*bar* vào mẫu thân mầm Coker310FR đạt cao nhất với 2,1% mô sẹo phát sinh phôi, tái sinh được 20,6 cây/mẫu, 30,2% số cây mang gen chuyển và 82,5% trong số cây đó hữu thụ.

Chọn được 5 dòng T_2 chuyển gen *bar* B1, B9, B18 và BF8, BF17 mang 1 bản sao, có hoạt động phiên mã của gen chuyển, cây sinh trưởng đồng đều và có mức độ chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate cao (0,6 kg ai./ha).

Chọn được 5 dòng T_2 chuyển gen *EPSPS* có 1 bản sao, có hoạt động phiên mã của gen chuyển và có mức độ chống chịu thuốc trừ cỏ Glyphosate là E7, E8, E19, EF14 và EF25, không có dòng chống chịu cao.

Hai dòng bông chuyển gen T_2 là B9 và BF17 mang 01 bản sao gen, di truyền gen chuyển theo quy luật Mendel, chống chịu cao với thuốc trừ cỏ Glufosinate ở nồng độ 0,6 kg ai./ha, không sai khác về đặc điểm thực vật học và khả năng chống chịu bệnh hại so với giống bông nền Coker310 không chuyển gen.

SUMMARY

The experiments of the thesis "Transformation of cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) for resisting to Glufosinate and Glyphosate herbicide using *A. tumefaciens*-mediated transgenic technique" were conducted at Nha Ho Research Institute for Cotton and Agriculture Development, Nhon Son Commune, Ninh Son District, Ninh Thuan Province. The research was applied on the cotton Coker310 variety and the Coker310FR line; two gene structures P35S-*EPSPS*-TNOS and PNOS-*bar*-TNOS; two transgenic vectors pCB301:nptII and pCAMBIA1300:hpt; and *A. tumefaciens* strain C58/ PGV2260. The research was conducted from 2013 to 2018. The research objective was to apply *A.tumefaciens*-mediated gene transfer method for transferring *EPSPS* and *bar* genes into cotton plants to create transgenic cotton lines which are high resistant to Glyphosate/Glufosinate herbicide. The results showed that:

The Coker310FR line selected through three generation-regeneration of Coker310 cotton variety expressed a very high regeneration capacity, with the rate of callus-embryogenesis was 95.6% and the rate of normal regenerated plants growing on GR5 medium was 36.7%.

Four transgenic vectors, including pCAMBIA1300:hpt-*bar*, pCAMBIA1300: *hpt-EPSPS*, pCB301:*npt*II-*bar* and pCB301:*npt*II-*EPSPS* were reconstructured by inserting the regions P35S-*EPSPS*-TNOS and PNOS-*bar*-TNOS into plant-expressed vector pCB301:*npt*II and pCAMBIA1300:*hpt*. The test for presence of 04 target genes and the virulent gene *Vir*C confirmed that 04 transgenic vectors were successfully transformed into *A. tumefaciens* strain C58/PGV2260.

The infection of *A. tumefaciens* containing *EPSPS* and *bar* genes on hypocotyl explants of the Coker310 plants at different densities, infection times, duration and temperatures significantly affected the rates of induction, survival and embryogenesis of transgenic callus. The best results were bacterial infection at a density of OD_{600} 0.75 for 10 minutes, co-culture for 64 hours at 22 °C.

The interaction between explant type/variety and the selection agents affected the rate of regeneration as well as rate of plants containing transgenes. The efficiency of transferring pCAMBIA1300:*bar* vector into Coker310FR cotyledon explants reached the highest rate of embryo-generated callus at 2.8%, 15.8 plants per explant were successfully regenerated, 76.0% of plants containing transgenes and 64.7% of them were fertility. The efficiency of transferring pCB301:*bar* vector into Coker310FR hypocotyl explants was highest with 2.1% of callus generated embryos, regenerating 20.6 plants per explant, 30.2% of them were transgenic plants in which 82.5% were fertility.

The combination of molecular and biological assessments resulted in the selection of 5 lines, i.e. B1, B6, B9, B18, and BF17. All of these lines were uniform growth plants containing single copy which expressed transcription activities of target genes and shown a high level of tolerance to Glufosinate.

The combination of molecular and biological assessments resulted in the selection of 5 lines, i.e. E7, E8, E19, EF14 and EF25. All of these lines were uniform growth plants containing single copy which expressed transcription activities of target genes and shown a moderate level of tolerance to Glyphosate.

Two T_2 transgenic cotton lines, i.e. B9 and BF17, carried one copy of the gene, which genetically followed the Mendel's rules. These transgenic lines were highly resistant to Glufosinate herbicide at a concentration of 0.6 kg ai./ha, had no difference in botanical characteristics and disease resistance in comparison with original non-transgenic Coker310 cotton plant.

KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

1-PPT	Phosphinothricin
2,4-D	2,4 Dichlorophenoxyacetic acid
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
AHAS	Acetohydroxyacid synthase
ALS	Kháng thuốc gốc sulfonylurea
aph(3')-II	*Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II*
RNA	Ribonucleic acid
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*
AS	acetosyringone
ASA	American Soybean Association -Hiệp hội Đậu nành Mỹ
BA	Benzyladenine
BVTV	Bảo vệ Thực vật
bar	Bialaphos
BĐG	Biến đổi gen
CAAS	Chinese Academy of Agricultural Sciences-Học viện Khoa học Nông nghiệp Trung Quốc
Cb	Carbenicillin
CERA	Center for environmental risk assessment-Trung tâm đánh giá rủi ro môi trường
CI	Callus induction-Cảm ứng mô sẹo
CNSH	Công nghệ Sinh học
CP	Môi trường nhân phôi
ctv	Cộng tác viên
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	*2'*-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
E.coli	*Escherichia coli*
EFSA	European Food Safety Authority

EI	Embryogenesis induction-ký hiệu môi trường cảm ứng phát sinh phôi
EP	Môi trường nuôi phôi
EPSP	5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase-Gen mã hóa enzyme *5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate* (*EPSP*) *synthase*
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization-Tổ chức Nông Lương Liên Hợp Quốc
GAA	Gaelic Athletic Association
GE	Genetic engineering
gfp	Green fluorescent protein-protein huỳnh quang
GM	Gene modification
GMP	Good Manufacturing Practice
GNA	Galanthus nivalis agglutinin
GOI	Genes of interest
GR	Germination regeneration- môi trường nẩy mầm, tái sinh cây
GUS	*Glucuronidase*
hpt	*Hygromycin phosphotransferase*
HR	Herbicide resistance-Tính kháng thuốc trừ cỏ
HT	Herbicide tolerance-Tính chống chịu thuốc trừ cỏ
Hv	*Hordeum vulgare* L.-Lúa mạch
Hy.	Hygromycin B
IAA	indole-3-acetic acid
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBA	Indole-3-butyric acid
ICAC	(International Cotton Advisory Committee) Ủy ban Tư vấn bông Quốc tế

ISAAA	Acquisition of Agri-biotech Applications
ISB	Information systems for biotechnology-hệ thống thông tin công nghệ sinh học
IR	Insecticide Resistance-Tính kháng thuốc diệt côn trùng
JAAS	Jiangsu Academy of Agriculture Sciences-Học viện Khoa học Nông nghiệp Jiangsu
Ka.	Kanamycin
LB	Left border
MCS	Multiple cloning site
MOA	Mode of action
MSB_5	Môi trường chứa muối MS và vitamin B_5
NAA	Naphthaleneacetic acid
NGS	Next generation sequencing-PP giải trình tự thế hệ mới
NN & PTNT	Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn
*npt*II	*Neomycin phosphotransferase*
OD_{600}	Optical density-mật độ quang ở bước sóng 600 nm
PAT	Phosphinothricin N-acetyltransferase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PPO	Protoporphyrinogen oxydase
PSII	Photosystem II
PTP	Pollen tube pathway
RB	Righ border
RG	Reporter genes
Rm	Rifampicin
RNA	Ribonucleic acid
S3P	Shikimate-3-phosphate
SMG	Selection marker genes
SG	Seed germination-ký hiệu môi trường nảy mầm hạt

Tc	Tetracycline
T-DNA	Transfer DNA
USDA	United States Department of Agriculture (Bộ Nông nghiệp Mỹ)
VIP3A	Vegetative insecticidal protein-protein diệt côn trùng
WHO	World Health Organization-Tổ chức y tế thế giới

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN ..... **I**

LỜI CẢM ƠN ..... **II**

TÓM TẮT ..... **III**

SUMMARY ..... **V**

KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT ..... **VII**

MỤC LỤC ..... **XI**

DANH MỤC HÌNH ẢNH ..... **XV**

DANH MỤC BẢNG ..... **XVII**

MỞ ĐẦU **1**

CHƯƠNG 1 ..... **5**

TỔNG QUAN TÀI LIỆU **5**

1.1 Sơ lược về cây bông **5**

1.2 Thực trạng sản xuất và tiêu thụ bông trên thế giới **5**

1.3 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ **6**

1.3.1 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ **6**

1.3.2 Cây bông biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ **9**

1.4 Cây trồng biến đổi gen ở Việt Nam **10**

1.5 Thuốc trừ cỏ và gen chống chịu thuốc trừ cỏ **12**

1.5.1 Thuốc trừ cỏ **12**

1.5.2 Gen kháng thuốc trừ cỏ **16**

1.6 Chuyển gen thực vật qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens* **19**

1.6.1 Vi khuẩn *A. tumefaciens* và hiện tượng biến nạp gen ở thực vật **19**

1.6.2 Vector biểu hiện ở thực vật **20**

1.6.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen **22**

1.7 Chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* trên cây bông **24**

1.7.1 Phương pháp chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens*...25
1.7.2 Tình hình nghiên cứu chuyển gen cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* ở Việt Nam 29
1.8 Sàng lọc và đánh giá cây chuyển gen.....31
1.8.1 Sàng lọc tế bào, mô hoặc cây chuyển gen nhờ gen chỉ thị chọn lọc 32
1.8.2 Xác định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào cây chuyển gen 35
1.8.3 Đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển trong cây chuyển gen 37
1.8.4 Đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ của cây bông chuyển gen *bar* và *EPSPS* 38
1.8.5 Di truyền gen chuyển 39
CHƯƠNG 2.....41
NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....41
2.1 Nội dung nghiên cứu 41
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....41
2.2.1 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông.....41
2.2.2 Chọn lọc dòng bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ.....54
2.2.3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate, đặc điểm thực vật học và khả năng mẫm cảm với một số bệnh hại chính của cây bông chuyển gen thế hệ T_2.....57
2.3 Hoá chất 59
2.4 Máy móc và thiết bị.....60
2.5 Phương pháp xử lý số liệu 60
CHƯƠNG 3.....61
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....61
3.1 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông.....61
3.1.1 Chọn lọc dòng Coker310FR có khả năng tái sinh cao 61
3.1.2 Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate và Glufosinate, tạo chủng *A. tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp 64

3.1.3 Xác định các thông số chuyển gen *EPSPS* và *bar* vào giống Coker310 qua trung gian *A. tumefaciens* 74
3.1.4 Chuyển các gen *EPSPS* và *bar* vào giống Coker310 và dòng Coker310FR.....83
3.2 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ.....91
3.2.1 Chọn lọc cây chuyển gen *bar* chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate....91
3.2.2 Chọn lọc cây chuyển gen *EPSPS* chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate 96
3.3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate, các đặc điểm thực vật học và khả năng mẫm cảm với một số bệnh hại chính của cây bông chuyển gen thế hệ T_2 102
3.3.1 Di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ của các dòng chuyển gen *bar* 102
3.3.2 Đánh giá kiểu hình, đặc điểm nông học và tính mẫn cảm với bệnh hại của cây chuyển gen thế hệ T_2 105
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 108
CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ 110
TÀI LIỆU THAM KHẢO 110
PHỤ LỤC 123
Phụ lục 1. Một số đặc điểm của giống bông Coker310 123
Phụ lục 2. Tên, hãng, nước sản xuất của hóa chất chính sử dụng trong đề tài 124
Phụ lục 3. Tên, chủng loại, hãng, nước sản xuất của máy móc, thiết bị chính sử dụng trong đề tài 125
Phụ luc 4. Các bước tái sinh cây bông thông qua phôi soma.....126
Phụ lục 5. Các quy trình sử dụng trong thiết kế và tái cấu trúc gen 127
Phụ luc 6. Các bước chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* 131

Phụ lục 7. Quy trình tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ lá bông non 137
Phụ lục 8. Quy trình PCR nhân gen *hpt, npt*II, *EPSPS, bar* và *vir*C 139
Phụ lục 9. Quy trình Southern blot 140
Phụ lục 10. Quy trình Northern blot 144
Phụ lục 11.1. Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng kanamycin và chống chịu Glufosinate của cây chuyển gen pCB301:*bar* (tháng 3/2014) 150
Phụ lục 11.2. Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng hygromycin và chống chịu Glufosinate cây chuyển gen pCAMBIA1300:*bar*.....152
Phụ lục 11.3. Tỷ lệ (%) cây kháng kháng sinh và chống chịu Glufosinate của các dòng bông chuyển gen *bar* thế hệ T_2.....155
Phụ lục 12.1. Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng kanamycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen pCB301:*EPSPS* thế hệ T_1 (tháng 10/2014) ...157
Phụ lục 12.2. Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng hygormycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS* thế hệ T_1.....158
Phụ lục 12.3. Tỷ lệ (%) kháng kanamycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2 (tháng 8 năm 2015) 161

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 2.1 Cấu trúc PCaMV 35S-EPSPS-TNOS.....44
Hình 2.2 Cấu trúc PNOS-bar-TNOS.....44
Hình 2.3 Sơ đồ vector pCB301:nptII 45
Hình 2.4 Sơ đồ vector pCAMBIA1300:hpt (www.cambia.org) 45
Hình 3.1 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen PNOS-bar-TNOS và vector pCB301 sau xử lý với enzyme giới hạn.....65
Hình 3.2 Sản phẩm PCR gen bar từ plasmid tái tổ hợp pCB301:bar.....66
Hình 3.3 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCB30:bar.....66
Hình 3.4 Sản phẩm tinh sạch cassette PNOS-bar-TNOS và vector pCAMBIA1300 sau xử lý với enzyme giới hạn 67
Hình 3.5 Sản phẩm PCR gen bar từ plasmid tái tổ hợp pCAMBIA:bar 67
Hình 3.6 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAMBIA:bar.....67
Hình 3.7 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen EPSPS và vector pCB301 sau xử lý với enzyme giới hạn 69
Hình 3.8 Sản phẩm PCR gen EPSPS từ plasmid tái tổ hợp pCB301:EPSPS 70
Hình 3.9 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCB301:EPSPS 70
Hình 3.10 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen EPSPS và vector pCAMBIA1300 sau xử lý với enzyme giới hạn.....70
Hình 3.11 Sản phẩm PCR gen EPSPS từ khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp pCAMBIA-EPSPS 72
Hình 3.12 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAMBIA-EPSPS.....72
Hình 3.13 Sơ đồ vùng T-DNA của 4 vector chuyển gen. 72
Hình 3.14 Sản phẩm PCR nhân gen virC, hpt, nptII, EPSPS và bar.....73
Hình 3.15 Lá mầm và thân mầm giống Coker310 chuyển gen cảm ứng mô sẹo 80
Hình 3.16 Quá trình tái sinh, ra cây và chọn lọc cây chuyển gen T_0. 85
Hình 3.17 Sản phẩm PCR cây chuyển gen bar thế hệ T_0 88
Hình 3.18 Sản phẩm PCR gen nptII, hpt và EPSPS trong cây chuyển gen T_0 90

Hình 3.19 Cây bông chuyển gen *bar* thế hệ T_1 trước và sau khi xử lý thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate (nồng độ 0,6 kg ai./ha), xử lý ở giai đoạn 4 - 5 lá. 93
Hình **3.20** Đánh giá các dòng chuyển gen *bar* thế hệ T_1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử 94
Hình 3.21 Dòng bông chuyển gen bar thế hệ T_2 xử lý Glufosinate ở giai đoạn 7 - 8 lá, liều lượng 0,6kg a.i/ha.....96
Hình 3.22 Dòng bông chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1 chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate, triệu chứng ở giai đoạn 10 ngày sau xử lý.....98
Hình 3.23 Đánh giá các dòng chuyển gen EPSPS thế hệ T_1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử.....99
Hình 3.24 Dòng bông chuyển gen EPSPS thế hệ T_2 chống chịu Glyphosate, triệu chứng ở giai đoạn 10 ngày sau xử lý 101
Hình 3.25 Thí nghiệm phân tích di truyền gen chuyển trong cây bông chuyển gen 102

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Tổ hợp nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và kinetin trong các môi trường CI 42
Bảng 2.2 Thành phần trong các môi trường GR 42
Bảng 2.3 Trình tự các cặp primer đặc hiệu và kích thước phân đoạn DNA dự kiến của các gen sàng lọc và gen đích trong cây chuyển gen 46
Bảng 3.1 Ảnh hưởng của môi trường cảm ứng mô sẹo đến tỷ lệ mẫu phát sinh phôi của giống Coker310 qua các thế hệ tái sinh 62
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của môi trường đến tỷ lệ cây tái sinh hoàn chỉnh của giống Coker310 qua các thế hệ 63
Bảng 3.3 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn (OD_{600}) đến tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi 75
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của thời gian nhiễm đến tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi 75
Bảng 3.5 Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ tái nhiễm A. tumefaciens 76
Bảng 3.6 Ảnh hưởng của ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy đến tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ nhiễm A. tumefaciens 78
Bảng 3.7 Ảnh hưởng của nồng độ AS đến số cây mang gen 79
Bảng 3.8 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ cây (%) không dị dạng từ mẫu lá mầm Coker310 chuyển gen 81
Bảng 3.9 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu thân mầm Coker310 chuyển gen 82
Bảng 3.10 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu lá mầm chuyển gen 83
Bảng 3.11 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu thân mầm chuyển gen 84
Bảng 3.12 Tổng hợp số cây tái sinh, kháng kháng sinh, mang gen và hữu thụ theo giống nền chuyển gen 86
Bảng 3.13 Tổng hợp kết quả chọn lọc cây chuyển gen *bar* thế hệ T_0 87

Bảng 3.14 Tổng hợp kết quả chọn lọc cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_0 89
Bảng 3.15 Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng kháng sinh và chống chịu Glufosinate của cây chuyển gen *bar* 91
Bảng 3.16 Tỷ lệ (%) cây chống chịu Glufosinate của các dòng bông chuyển gen bar thế hệ T_2 95
Bảng 3.17 Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng kháng sinh và chống chịu thuốc trừ cỏ Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1 97
Bảng 3.18 Tỷ lệ (%) cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2 100
Bảng 3.19 Phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate của dòng B9.....103
Bảng 3.20 Phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate của dòng BF17 104
Bảng 3.21 So sánh các đặc điểm nông sinh học, hình thái và tính mẫn cảm với bệnh hại của các dòng bông chuyển gen bar với giống bông nền Coker310 106

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Cùng với sâu bệnh hại, cỏ dại là một trong những tác nhân quan trọng làm giảm năng suất, sản lượng và phẩm chất cây trồng. Cỏ dại cạnh tranh dinh dưỡng, ánh sáng và nước với cây trồng, đồng thời là nơi trú ẩn của một số loài sâu bệnh hại. Thật khó ước lượng được sự thiệt hại do cỏ dại gây ra trên các loại cây trồng. Vì vậy, việc phòng trừ cỏ dại là vấn đề cấp bách và có tầm quan trọng đặc biệt nhằm bảo vệ cây trồng, nâng cao năng suất và phẩm chất. Trong số các biện pháp phòng trừ, biện pháp hóa học hay nói cách khác là sử dụng các loại thuốc trừ cỏ đã, đang và luôn là biện pháp đạt hiệu quả nhanh chóng và phổ biến. Ứng dụng biện pháp này trong phòng trừ cỏ dại đã trở nên thông dụng, đem lại hiệu quả kinh tế và giải quyết được vấn đề nhân lực. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc phải tuân theo trình tự và quy trình nghiêm ngặt, nếu không sẽ gây ảnh hưởng đến sinh trưởng, năng suất của cây. Hiện nay, bằng kỹ thuật chuyển các gen chống chịu thuốc trừ cỏ vào cây trồng đã khắc phục được khó khăn trong sử dụng thuốc cũng như mở ra kỷ nguyên mới có tính chất đột phá cho nền nông nghiệp.

Trên thế giới, bông (*Gossypium* sp.) là cây trồng kinh tế lấy sợi tự nhiên quan trọng. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng có 3 chiến lược quan trọng nhất trên cây bông là (i) phòng trừ cỏ dại, (ii) bón phân và (iii) phòng trừ sâu bệnh, trong đó, phòng trừ cỏ dại lại quan trọng bậc nhất, đặc biệt, việc phòng trừ cỏ dại trở thành vấn đề lớn hơn khi người trồng bông bị hạn chế về nguồn lao động và trồng bông trên những trang trại quy mô lớn (ICAC, 2008). Việc chấp thuận cây bông biến đổi gen đã tạo bước phát triển đột phá cho ngành sản xuất bông thế giới. Sau hơn 20 năm thương mại hóa, cây bông biến đổi gen được trồng với diện tích khoảng 24 triệu ha và sản lượng chiếm 70% sản lượng bông toàn cầu (James, 2018). Với ưu thế tăng năng suất và chất lượng, giảm chi phí sản xuất, tăng hiệu quả kinh tế và giảm nguy cơ ô nhiễm môi trường, nên cây bông biến đổi gen đang ngày càng được người nông dân trồng bông trên thế giới hưởng ứng và chấp nhận trồng rộng rãi.

Việt Nam cũng có tiềm năng lớn cho việc chấp thuận cây bông công nghệ sinh học (CNSH) vì hiện là nước phát triển nhanh nhất về công nghiệp dệt may, các sản phẩm từ bông vải được xuất khẩu với tốc độ ngày càng tăng. Nước ta cũng đã thực hiện các thỏa thuận thương mại tự do với nhiều đối tác thương mại nhập các sản phẩm có nguồn gốc từ cây bông. Với sự tăng trưởng ngày càng mạnh mẽ của ngành dệt may, Việt Nam sẽ phải tiếp tục nhập khẩu thêm bông trong ngắn đến trung hạn và hiện là một trong 5 quốc gia nhập khẩu bông nhiều nhất thế giới (FAO, 2018). Nguồn cung bông trong nước từ các nhà sản xuất trong nước chỉ có thể cung cấp dưới 1% nhu cầu của thị trường và thậm chí là nhà nhập khẩu 100% bông trong tương lai rất gần. Hiện trạng đó là do giá bông toàn cầu thấp trong khi chi phí sản xuất bông trong nước cao, phải cạnh tranh diện tích với cây trồng có lợi nhuận cao hơn và cây thức ăn gia súc, ít được khuyến khích từ nhà nước và các cam kết của các công ty kinh doanh bông (USDA, 2019). Tuy nhiên, giá bông toàn cầu đang dần tăng, nông dân có thể chọn trồng bông CNSH và giảm nhập khẩu bông trong tương lai. Vì thế, sản xuất bông Việt Nam rất cần giống đem lại hiệu quả kinh tế cũng như giải quyết được vấn đề nhân lực và như vậy, việc ứng dụng các kỹ thuật chuyển gen để tạo giống bông có năng suất cao, chống chịu điều kiện bất thuận cũng như thuốc trừ cỏ là cần thiết.

Có nhiều phương pháp chuyển gen quan tâm vào thực vật mục tiêu, bao gồm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens,* trực tiếp bằng bắn gen và vi tiêm qua đường ống phấn,… Vấn đề chính của nhóm phương pháp chuyển gen trực tiếp là chèn DNA ngẫu nhiên và phần lớn gặp khó khăn trong dự đoán kết quả. Phương pháp hiệu quả nhất để biến đổi bộ gen nhân thực vật được biết đến cho đến nay trong điều kiện phòng thí nghiệm là qua trung gian *A. tumefaciens*. Riêng với cây bông, sự phát triển của kỹ thuật chuyển gen trong 3 thập kỷ qua đã góp phần cải thiện tính kháng côn trùng, chống chịu thuốc trừ cỏ, chất lượng xơ và năng suất. Chuyển gen qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens* là phương pháp được ưa thích để đưa gen chuyển vào bộ gen bông, vì có các ưu điểm như: (i) không đòi hỏi trang thiết bị, dụng cụ đặc biệt, đắt tiền; (ii) số bản sao gen chuyển thấp và di truyền ổn định ở thế hệ con cháu; (iii) dễ dàng thao tác *in vitro*; và (iv) là kỹ thuật đơn giản và có chi phí thấp.

Hiện có nhiều gen kháng thuốc trừ cỏ, trong đó gen *EPSPS* mã hóa enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase có khả năng kháng thuốc gốc Glyphosate và gen *bar* biểu hiện bialaphos acetyltransferase có khả năng kháng thuốc gốc Glufosinate. Hai loại thuốc trừ cỏ này có hệ thống phân loại rõ ràng, đã và đang được sử dụng rộng rãi để kiểm soát không chọn lọc đối với các loài cỏ dại thường niên và đa niên. Gen *EPSPS* và gen *bar* đã được chuyển vào nhiều cây trồng để nâng cao hiệu quả kinh tế, tăng năng suất và giảm chi phí cũng như nhân công trong việc phòng trừ cỏ dại.

Xuất phát từ tình hình nghiên cứu, yêu cầu của sản xuất bông trong nước, đề tài "**Tạo dòng bông (*Gossypium hirsutum* L.) chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate và Glyphosate bằng kỹ thuật chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens***" được tiến hành.

Mục tiêu của đề tài

- Chuyển được gen *bar* và *EPSPS* vào giống bông Coker310 bằng phương pháp chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens.*

- Tạo ra dòng bông chuyển gen chống chịu cao (chịu được liều lượng gấp 2 lần liều lượng khuyến cáo) với thuốc trừ cỏ Glufosinate hoặc Glyphosate làm vật liệu cho chọn tạo giống bông chống chịu thuốc trừ cỏ trong nước.

Yêu cầu của đề tài

Thực hiện chọn dòng bông có khả năng tái sinh cao, tái cấu trúc vector chuyển gen, xác định được các thông tin và dữ liệu khoa học trong quy trình chuyển gen.

Ứng dụng phương pháp chuyển gen qua trung gian *A.tumefaciens* để chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông.

Sàng lọc, đánh giá và chọn lọc được dòng bông chuyển gen thế hệ T_2 chống chịu cao với thuốc trừ cỏ Glufosinate hoặc Glyphosate.

Đối tượng nghiên cứu

Các dòng bông mang đặc tính chống chịu thuốc giệt cỏ gốc Glufosinate và Glyphosate

Giới hạn nghiên cứu

Tạo các dòng bông chuyển gen thế hệ T_2 chống chịu cao với thuốc trừ cỏ Glyphosate hoặc Glufosinate.

Ý nghĩa khoa học

Cung cấp thông tin, dữ liệu khoa học về tái sinh, tái cấu trúc vector chuyển gen, chuyển gen vào cây bông, sàng lọc, đánh giá và chọn lọc cây bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ. Góp phần phát triển lĩnh vực khoa học chuyển gen thực vật và chọn tạo giống cây chịu thuốc trừ cỏ trong nước.

Đưa kỹ thuật chuyển gen cây bông trở thành công cụ hỗ trợ đắc lực cho công tác chọn tạo giống bông truyền thống trong nước và làm cơ sở áp dụng để chọn tạo các loại giống cây trồng chịu thuốc trừ cỏ khác.

Ý nghĩa thực tiễn

Cung cấp bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ cho công tác lai tạo và chọn lọc giống bông, phù hợp với định hướng phát triển nông nghiệp ứng dụng công nghệ cao trong giai đoạn hiện nay.

Nhờ có giống bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ sử dụng trong sản xuất, sẽ góp phần giảm thiểu rủi ro cho nông dân, giảm chi phí sản xuất, hạ giá thành sản phẩm, tăng thu nhập cho người trồng bông và bảo vệ môi trường sống.

Đóng góp mới của luận án

Đã đề xuất được dòng bông có khả năng tái sinh cao giúp cải thiện hiệu quả chuyển gen thông qua việc tăng tối đa khả năng phát sinh phôi soma từ mô sẹo. Tạo và biến nạp thành công 4 cấu trúc biểu hiện gen chống chịu thuốc trừ cỏ.

Đã tạo ra và chọn lọc được 02 dòng bông T_2 chống chịu cao với Glufosinate là B9 và BF17 mang một bản sao gen, di truyền gen chuyển theo quy luật Mendel, không khác biệt về đặc điểm thực vật học và khả năng chống chịu bệnh hại chính so với giống bông nền không chuyển gen.

Chương 1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Sơ lược về cây bông

Cây bông (*Gossypium* sp.) thuộc chi Bông (*Gossypium*), họ Cẩm Quỳ (Malvaceae). Chi Bông có 45-50 loài, trong đó, 40-45 loài nhị bội (2n = 2x = 26) và 5 loài tứ bội (2n = 4x = 52). Bông Luồi (*G. hirsutum* L.) thuộc nhóm tứ bội, còn được gọi là bông Mexico, là loài bông được trồng rộng rãi nhất trên thế giới, chiếm khoảng 90% sản lượng bông toàn cầu (USDA, 2019). Bông Luồi có nguồn gốc từ Mexico, Tây Ấn, Bắc Nam Mỹ, Trung Mỹ và có thể cả vùng nhiệt đới Florida (Wendel, 1992). *G. hirsutum* L. bao gồm một số giống với độ dài xơ khác nhau và có có khả năng chịu thâm canh. Bên cạnh lấy sợi, bông Luồi và bông Hải Đảo (*G. herbaceum* L.) là hai loài chính được sử dụng để sản xuất dầu hạt bông (USDA, 2019).

1.2 Thực trạng sản xuất và tiêu thụ bông trên thế giới

Theo ICAC (2018), trong niên vụ 2018/2019, sản lượng bông toàn cầu đạt 26,3 triệu tấn bông xơ. Các nước sản xuất bông chính, chiếm 90% sản lượng toàn cầu là Ấn Độ, Trung Quốc, Mỹ, Braxin, Pakistan, Tây Phi, Thổ Nhĩ Kỳ, Úc và Uzbekistan. Đáng chú ý, trong niên vụ này có sự gia tăng sản lượng của Braxin và Tây Phi (ICAC, 2018).

Hai nhà sản xuất hàng đầu Trung Quốc và Ấn Độ chiếm khoảng 50% sản lượng và năm nhà sản xuất hàng đầu chiếm hơn 75% sản lượng bông toàn cầu. Hiện tại, Ấn Độ là nhà sản xuất bông lớn nhất thế giới, việc sử dụng hạt giống biến đổi gen và sự dồi dào của lao động giá rẻ đã làm giảm chi phí sản xuất bông và tăng sản lượng nội địa, kết hợp với việc giảm sản lượng bông của Trung Quốc, cho phép Ấn Độ dẫn đầu sản xuất. Hoa Kỳ là nhà sản xuất bông lớn thứ ba trên toàn cầu. Sản lượng bông của Hoa Kỳ giảm đáng kể từ năm 2005 đến 2008 do thời tiết khắc nghiệt và bị cạnh tranh

bởi các loại cây trồng khác, đặc biệt là ngô và đậu nành. Tuy nhiên, kể từ năm 2015, sản lượng bông của Hoa Kỳ đã tăng trở lại, do giá bông thuận lợi so với các loại cây trồng khác và nhu cầu bông tăng cao trên toàn cầu đã khuyến khích nông dân tăng sản lượng (USDA, 2019).

Trước năm 2014, Trung Quốc là nhà nhập khẩu bông nhiều nhất thế giới. Dệt may là ngành sản xuất chủ lực trong phát triển kinh tế kể từ khi nước này gia nhập WTO năm 2001. Từ năm 2010, chính phủ Trung Quốc xây dựng các kho dự trữ bông chiến lược để bảo vệ ngành dệt may của họ. Trung Quốc loại bỏ dự trữ bông vào năm 2014, nên mức nhập khẩu hiện nay tương đương với các nước khác (USDA, 2019). Tính đến 2018, Bangladesh dẫn đầu thế giới về nhập khẩu bông, tiếp theo là Việt Nam và Trung Quốc (FAO, 2018).

Hoa Kỳ là nước dẫn đầu về xuất khẩu toàn cầu, chiếm khoảng 38% thị trường xuất khẩu sợi bông thô. Năm nhà xuất khẩu hàng đầu khác cộng lại vẫn thấp hơn so với Hoa Kỳ trên thị trường toàn cầu. Mặc dù vậy, mức xuất khẩu bông đã thay đổi theo thời gian. Năm 2011, do giá cả tăng cao, khuyến khích sản xuất trong nước làm cho mức xuất khẩu của Ấn Độ gần như vượt qua Hoa Kỳ. Mặt khác, nhu cầu từ Trung Quốc cũng thúc đẩy Ấn Độ xuất khẩu trong năm 2013. Trong niên vụ 2016/17, mức xuất khẩu bông của Hoa Kỳ đã tăng trở lại. Sự thay đổi này được tạo ra bởi việc sử dụng giống chất lượng cao, cùng với việc giảm sản lượng từ các nhà sản xuất khác mà chủ yếu là Ấn Độ và Brazil. Mức xuất khẩu của Hoa Kỳ mạnh bền vững kể từ đó (USDA, 2019).

Tóm lại: Trên toàn cầu, sản xuất và tiêu thụ bông có thể thay đổi, nhưng xu hướng tăng trưởng dài hạn vẫn tiếp tục. Các yếu tố chính thúc đẩy sự tăng trưởng cung cầu về bông bao gồm việc *tạo giống mới bằng công nghệ sinh học*, tăng cơ giới hóa trang trại, tăng trưởng dân số và tăng trưởng kinh tế.

1.3 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ

1.3.1 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ

Chống chịu thuốc trừ cỏ là tính trạng chiếm ưu thế đối với cây trồng biến đổi gen hiện nay và sẽ còn như vậy trong tương lai. Cây trồng biến đổi gen chống chịu

thuốc trừ cỏ phổ rộng Glyphosate và Glufosinate lần đầu tiên được trồng thương mại vào năm 1996 (James, 2019) và cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ khác đang được phát triển (Green, 2014), hoặc đã có trên thị trường, với nhiều tính trạng chống chịu thuốc ngày càng tăng và nhiều tính trạng được kết hợp trong một loại cây trồng (USDA, 2015). Tính đến năm 2008, gần 90% loại cây trồng biến đổi gen được trồng trên toàn thế giới là chống chịu Glyphosate (Duke, 2014). Trong khi nhiều loài cây trồng biến đổi gen đã được thử nghiệm trên đồng ruộng, chỉ có bốn loài được trồng rộng rãi từ cuối những năm 1990 là đậu nành, ngô, bông và cải dầu (Brookes và Barfoot, 2015). Năm 2013, trong số 175,2 triệu ha diện tích cây trồng BĐG toàn cầu, khoảng 57% (99,4 triệu ha) được trồng bằng các giống HR và 27% (47 triệu ha) với các cây có đặc tính kép HR/IR (vừa chống chịu thuốc cỏ vừa chống chịu sâu) (James, 2013). Do đó, 84% diện tích là cây trồng BĐG mang gen HR (146,4 triệu ha). Đậu tương HR là cây trồng biến đổi gen và được trồng chủ yếu ở Bắc và Nam Mỹ, chiếm khoảng 80% diện tích đậu tương toàn cầu và 46% tổng diện tích cây trồng BĐG (Brookes và Barfoot, 2015). Đối với ngô BĐG và bông BĐG, các đặc điểm HR thường được kết hợp với IR. Ở Mỹ, các loại cây trồng HR như cỏ linh lăng, củ cải đường, cỏ thảm (bentgrass) và lúa đã được điều chỉnh quy định khi thương mại hóa hoặc đang chờ xử lý để bãi bỏ quy định (USDA, 2015). Theo James (2018) cây trồng BĐG đa tính trạng chiếm 41% diện tích canh tác toàn cầu, xếp thứ 2 sau cây trồng với đơn tính trạng chống chịu thuốc trừ cỏ (47%). Tính trạng biến đổi đơn gen chống chịu thuốc trừ cỏ trên cây đậu nành, cải dầu, ngô, cỏ linh lăng và bông hiện vẫn giữ ngôi vị thống trị với 47% diện tích canh tác toàn cầu (James, 2018).

Ba nước là Mỹ, Brazil và Argentina trồng nhiều cây trồng BĐG nhất, chiếm 77% tổng diện tích cây BĐG toàn cầu tính theo quốc gia và chiếm 94% diện tích cho 3 loại cây trồng chính là đậu nành, ngô và bông. Phân chia theo tính trạng thì 85% là chống chịu thuốc trừ cỏ, bao gồm đơn tính trạng và đa tính trạng kết hợp chống chịu thuốc trừ cỏ và kháng sâu (Bonny, 2016).

Do tác động của cỏ dại chống chịu thuốc trừ cỏ, các nhà khoa học nghiên cứu về cỏ dại và các công ty hạt giống BĐG đã khuyến khích nông dân áp dụng các biện

pháp quản lý cỏ dại tốt hơn. Ngoài ra, giải pháp mà các công ty đưa ra là chuyển hướng sang cây trồng BĐG có tính chống chịu khác với Glyphosate (hoặc một loại thuốc trừ cỏ khác) được kết hợp với nhau với một hoặc hai tính trạng HR như khả năng chịu 2,4-D, Dicamba, Glufosinate,... Mục đích là để đối phó với vấn đề cỏ dại chống chịu Glyphosate trong khi tiếp tục sử dụng cây trồng HR (Green và Owen, 2011).

Khi cỏ dại chống chịu Glyphosate đã bắt đầu phát triển và lan rộng, hướng ứng dụng Công nghệ sinh học được theo đuổi. Vì vậy, các công ty CNSH nông nghiệp vẫn đang tìm cách bổ sung các đặc điểm chống chịu thuốc trừ cỏ mới và kết hợp chúng lại, thay vì giảm dần mối quan hệ với các loại tính trạng này. Các đặc điểm HR mới xuất hiện sinh lợi hơn hiện tại và chắc chắn hơn cho tương lai gần. Các loại tính trạng khác liên quan đến chất lượng thực phẩm, khả năng chịu hạn, năng lượng sinh học, hóa học và đa chất, đang được phát triển và được cho là làn sóng tiếp theo của công nghệ sinh học nông nghiệp (Bonny, 2016). Các công ty cũng đang đầu tư vào các ứng dụng công nghệ sinh học khác như thuốc trừ sâu sinh học, cũng như các công cụ để nông dân thu thập và phân tích dữ liệu để canh tác chính xác. *Do đó, cây trồng HR có thể vẫn được sử dụng một thời gian khá dài nữa, trong khi các sản phẩm hoặc dịch vụ tiếp theo đang được phát triển.*

Ý nghĩa của bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ

Theo ISAAA lợi thế của trồng cây bông chống chịu thuốc trừ cỏ nói riêng và cây trồng chống chịu thuốc trừ cỏ khác nói chung là: (i) kiểm soát cỏ dại rất tốt, do đó, năng suất cây trồng cao hơn; (ii) linh hoạt kiểm soát cỏ dại ở giai đoạn cuối vụ; (iii) giảm sử dụng nhiên liệu, vì ít phải phun thuốc trừ cỏ; (iv) giảm nén chặt đất, vì ít phải đi lại trên mặt đất để phun thuốc; (v) sử dụng các hoá chất có độc tính thấp, nên tồn dư độc trong đất không đáng kể; và (vi) có thể sử dụng các hệ thống canh tác không làm đất hoặc làm đất tối thiểu, đem lại lợi ích cho kết cấu đất và các vi sinh vật đất (James, 2017).

Một nghiên cứu được tiến hành bởi Hiệp hội Đậu nành Mỹ (ASA) về số lần làm đất ở các nông trại đậu nành cho thấy rằng, có số lượng đáng kể nông dân chấp nhận biện pháp kỹ thuật "không làm đất" hoặc "làm đất tối thiểu" sau khi trồng giống đậu

nành chịu thuốc trừ cỏ. Phương pháp quản lý cỏ dại đơn giản này đã tiết kiệm được trên 234 triệu gallon nhiên liệu và khoảng 247 triệu tấn lớp đất mặt không bị xáo trộn (James, 2017).

1.3.2 Cây bông biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ

Cây bông chuyển gen được trồng thương mại lần đầu tiên trên thế giới vào năm 1996, chủ yếu ở Mỹ, với diện tích chỉ khoảng 0,8 triệu ha (James, 2019). Từ đó đến nay, diện tích trồng bông chuyển gen của thế giới liên tục tăng nhanh. Thống kê trong năm 2015, diện tích trồng bông chuyển gen toàn cầu khoảng 25,1 triệu ha chiếm 68% tổng diện tích. Các nước đang trồng nhiều bông chuyển gen là Ấn Độ (11,6 triệu ha), Trung Quốc (3,9 triệu ha), Mỹ (3,7 triệu ha) và Pakistan (2,9 triệu ha) (James, 2017).

Theo tính trạng, có 2 loại bông chuyển gen là bông kháng sâu (insect resistant cotton) và bông chống chịu thuốc trừ cỏ (herbicide resistant cotton); theo sự hiện diện của gen chuyển, có 3 loại bông chuyển gen là bông kháng sâu, bông chống chịu thuốc trừ cỏ và bông vừa kháng sâu vừa chống chịu thuốc trừ cỏ (tính kháng kết hợp).

Hiện trên thế giới có 27 giống bông chuyển gen (Event ID) được đăng ký bản quyền sử dụng (CERA, 2015), thuộc 3 nhóm. Nhóm giống chuyển gen kháng sâu: Nhóm này có 7 giống kháng sâu bộ cánh vảy là 3006-210-23, Event-1, MON531/757/1076 hay Bollgard® (CryIAc), 281-24-236 CryIF), COT67B (Flcry1Ab), COT102 (Vip3a) và MON 15985 hay Bollgard II® (CryIAc và CryIIAb). Nhóm giống chuyển gen chịu thuốc trừ cỏ: Nhóm này cũng có 7 giống chịu các loại thuốc trừ cỏ khác nhau là GHB614 hay GlyTol™ Cotton, MON1445/1698 hay Roundup Ready®, MON88913 hay Roundup Ready® Flex (CP4 *EPSPS*; kháng thuốc gốc Glyphosate), 19-51A (ALS: kháng thuốc gốc sulfonylurea), BXN (bxn: kháng thuốc gốc oxynil), LLCotton25 (*bar*: kháng thuốc gốc phosphinothricin, đặc biệt là Glufosinate ammonium) và DAS-81910-7 (aad-12 và *pat*: kháng nhiều thuốc trừ cỏ). Nhóm giống bông chuyển gen vừa kháng sâu và chịu thuốc trừ cỏ (nhóm đa tính trạng): Nhóm này có 13 loại giống, chúng mang đồng thời 2, 3 hoặc 4 gen kháng sâu và chịu thuốc trừ cỏ thuộc 2 nhóm giống bông chuyển gen trên.

Trên thế giới, diện tích gieo trồng các loại giống bông vừa kháng sâu vừa chống chịu thuốc trừ cỏ vẫn tăng lên nhanh chóng. Ở Mỹ, diện tích trồng các giống bông này trong năm 2015 chiếm tới 79% tổng diện tích (USDA, 2015).

1.4 Cây trồng biến đổi gen ở Việt Nam

Ngô BĐG, cây trồng công nghệ sinh học đầu tiên được thương mại hóa tại Việt Nam vào năm 2015, diện tích trồng đạt 45.000 ha vào năm 2017. Đây là mức tăng đáng kể, tăng 13 lần kể từ năm 2015 với 3.500 ha. Năm 2017 có 37.500 nông dân trồng 45.000 ha cây CNSH, đây cũng là mức tăng đáng kể về diện tích, tăng 29% so với 35.000 ha trong năm 2016. Các giống ngô BĐG được trồng từ năm 2015 về cơ bản là những giống kháng đồng thời kháng sâu hại và thuốc trừ cỏ (ngô có đặc tính kép IR/HR). Kể từ năm 2015, đã có 22 sự kiện được phê duyệt cho thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và canh tác, trong đó 14 sự kiện ngô và 8 sự kiện đậu tương. Theo tính trạng có 05 sự kiện BĐG, trong đó 01 sự kiện chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ và 04 sự kiện có đặc tính chồng IR/HR đã được phê duyệt để thương mại hóa trong nước (James, 2018).

Tính đến tháng 11 năm 2017, đã có 51 hồ sơ trình phê duyệt các sự kiện công nghệ sinh học cho mục đích thực phẩm/thức ăn chăn nuôi, trong đó có 21 hồ sơ đã được phê duyệt và 30 hồ sơ vẫn đang chờ xử lý. Tất cả hồ sơ đã được phê duyệt là cho các sự kiện ngô và đậu nành CNSH, các sự kiện CNSH đang chờ xử lý là cho các loại cây trồng như bông, cải dầu, củ cải đường, cỏ linh lăng và một số sự kiện ngô và đậu nành khác (USDA, 2019).

Việt Nam vẫn là nhà nhập khẩu chính các sản phẩm thực vật CNSH quan trọng như ngô, phụ phẩm, đậu nành để sản xuất thức ăn chăn nuôi và sợi bông cho ngành dệt (USDA, 2019). Theo Brookes và Barfoot (2018), Việt Nam bắt đầu áp dụng ngô CNSH vào năm 2015 và nó đang dần đóng góp vào lợi nhuận, dự kiến sẽ góp phần làm giảm nhập khẩu ngô. Tuy nhiên, chính sách chuyển đổi trồng lúa sang trồng ngô vẫn cần nhiều nỗ lực hơn vì chỉ một số ít nông dân ở sông Mê Kông (trồng lúa ba vụ một năm) chuyển sang trồng ngô. Ngoài ra, việc nhập khẩu ngô giá thấp hiện tại dễ dàng hơn so với sản xuất trong nước có chi phí sản xuất đắt hơn. Do đó, để tăng diện

tích ngô CNSH ở Việt Nam, cần phải tăng sự chấp nhận của nông dân và tuân thủ gói công nghệ do các nhà phát triển cung cấp là cần thiết (Brookes và Barfoot, 2018).

Đối với nguồn protein dùng trong thức ăn chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản, và các ngành công nghiệp thực phẩm phụ thuộc nhiều vào bột đậu nành nhập khẩu, bao gồm 20% bột đậu nành cho thức ăn chăn nuôi và 25% cho thức ăn thủy sản. Sản xuất đậu nành trong nước đang giảm do nông dân chuyển sang trồng lúa và ngô có lợi hơn. Để đáp ứng nhu cầu trong nước, chính phủ sẽ phải nhập khẩu khoảng 5 triệu tấn mỗi năm. Hơn nữa, số lượng nhập khẩu có thể tăng phụ thuộc vào việc mở rộng các nhà máy chế biến đậu nành hiện có hoặc xây dựng các nhà máy mới (USDA, 2019). Tám sự kiện đậu nành CNSH đã được phê duyệt trong nước cho chế biến thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, nhưng không cho trồng trọt. Diện tích đậu nành CNSH được trồng trên toàn cầu đã tăng lên từ năm 1996 và chiếm hơn 50% diện tích cây trồng CNSH toàn cầu. Lợi ích dưới dạng tăng năng suất, chi phí sản xuất thấp và chất lượng sản phẩm tốt đã truyền cảm hứng cho nông dân trồng với diện tích ngày càng tăng trong 22 năm qua. Việt Nam có diện tích tiềm năng hơn 100.000 ha trồng đậu nành, có thể cung cấp các sản phẩm đậu nành cần thiết cho sử dụng trong nước nếu đậu nành CNSH được áp dụng (James, 2019).

Việt Nam cũng có tiềm năng lớn cho việc chấp thuận cây bông CNSH vì hiện là nước phát triển nhanh nhất về công nghiệp dệt-may, các sản phẩm từ bông vải được Trung Quốc, Thổ Nhĩ Kỳ và Hàn Quốc nhập khẩu với tốc độ ngày càng tăng. Nước ta cũng đã thực hiện các thỏa thuận thương mại tự do với các đối tác thương mại này. Với sự tăng trưởng ngày càng mạnh mẽ của ngành dệt may, Việt Nam sẽ phải tiếp tục nhập khẩu thêm bông trong ngắn đến trung hạn. Niên vụ 2016/2017, nhập khẩu bông đạt 1,2 triệu tấn (5,5 triệu kiện), tăng 20% so với 2015/2016, trong khi nhập khẩu 2017 – 2018 là 1,4 triệu tấn, tăng 15% so với năm 2016 – 2017 và hiện vẫn đang là một trong 5 quốc gia nhập khẩu bông nhiều nhất thế giới (FAO, 2018). Nguồn cung bông trong nước từ các nhà sản xuất trong nước chỉ có thể cung cấp dưới 1% nhu cầu của thị trường và thậm chí có thể là nhà nhập khẩu 100% bông trong tương lai rất gần. Điều này là do giá bông toàn cầu thấp trong khi chi phí sản xuất bông trong nước

cao; phải cạnh tranh diện tích với cây trồng có lợi nhuận cao hơn và cây thức ăn gia súc; ít được khuyến khích từ nhà nước và các cam kết của Công ty bông (USDA, 2019). Trồng bông CNSH tương tự như nước Trung Quốc có thể vẫn còn rất xa vời. Tuy nhiên, giá bông toàn cầu đang dần tăng, nông dân có thể chọn trồng bông CNSH và giảm nhập khẩu bông trong tương lai (James, 2019).

***Tóm lại**, Việt Nam quan tâm đến việc sản xuất bông của riêng mình vì ngành dệt may đang phải nhập khẩu sợi bông hoàn toàn. Các thị trường xuất khẩu lớn như Trung Quốc, Thổ Nhĩ Kỳ và Hàn Quốc đã thúc đẩy ngành dệt may tăng trưởng mạnh mẽ, mặc dù sử dụng bông nhập khẩu. Các vùng trồng bông dần giảm đi do sự cạnh tranh gay gắt từ các loại cây trồng khác và cây thức ăn gia súc. Với giá bông toàn cầu tăng, nó có thể sớm là cây trồng ưa thích của nông dân.*

1.5 Thuốc trừ cỏ và gen chống chịu thuốc trừ cỏ

1.5.1 Thuốc trừ cỏ

Thuốc trừ cỏ là những chất hóa học được sử dụng để kiểm soát thực vật không mong muốn, là hóa chất gây độc tế bào được sử dụng để tiêu diệt các loại cỏ dại khác nhau hoặc kìm hãm sự phát triển của chúng. Thuốc trừ cỏ chọn lọc kiểm soát các loài cỏ dại cụ thể, giữ lại loại cây trồng mong muốn-bị ảnh hưởng không đáng kể. Thuốc trừ cỏ không chọn lọc (còn gọi là thuốc trừ cỏ phổ rộng, cỏ cháy trong các sản phẩm thương mại) có thể được sử dụng để dọn sạch đất thải, khai hoang… và những vật liệu thực vật khác. Ngoài chọn lọc /không chọn lọc, các khác biệt quan trọng khác bao gồm tính bền (còn gọi là tồn dư), dạng hấp thụ (qua lá, qua rễ hoặc bằng các con đường khác) và cơ chế tác động của chúng (Green và Owen, 2011).

Thuốc trừ cỏ hiện đại thường là mô phỏng tổng hợp của các hormon thực vật tự nhiên gây cản trở sự phát triển của cây mục tiêu. Do kháng thuốc trừ cỏ (mối quan tâm chính trong nông nghiệp) nên người ta thường tạo ra sản phẩm kết hợp thuốc trừ cỏ với các cơ chế tác động khác nhau. Quản lý dịch hại tổng hợp có thể sử dụng thuốc trừ cỏ cùng với các phương pháp kiểm soát dịch hại khác (Green và Owen, 2011).

Các nhóm WSSA (Hiệp hội khoa học cỏ dại Hoa Kỳ) và HRAC (Ủy ban hành động chống kháng thuốc trừ cỏ) đã phân loại thuốc trừ cỏ và ký hiệu cấp độ ảnh hưởng bằng số và chữ cái (Retzinger và Smith, 1997), để phân loại cơ chế tác động và dán nhãn sản phẩm thuốc trừ cỏ, cung cấp thông tin cho người dùng một cách đơn giản, dễ hiểu. Hầu hết các loại thuốc trừ cỏ hiện nay dùng trong hệ thống canh tác như ngô, đậu nành và bông, thường ở dạng hỗn hợp để kiểm soát phổ rộng của các loài cỏ dại (Green và Owen, 2011).

1.5.1.1 Glufosinate

Glufosinate (còn gọi là phosphinothricin, thương phẩm ở dạng muối amoni) là loại thuốc trừ cỏ nội hấp, phổ rộng, có công thức hóa học $C_5H_{15}N_2O_4P$. Nó ức chế enzyme cần thiết cho việc tổng hợp glutamin (*glutamine synthetase*) và giải độc amoniac. Phun Glufosinate cho thực vật làm giảm hàm lượng glutamin và tăng hàm lượng amoniac trong các mô, làm dừng quang hợp, dẫn đến chết cây (Donn và Köcher, 2012).

Trong thập niên 1960 và đầu thập niên 1970, các nhà khoa học ở Đại học Tübingen - Đức và Công ty Kaisha Meiji Seika - Nhật đã độc lập khám phá ra loài *Streptomyces* sản sinh các tripeptide gọi là bialaphos ức chế được vi khuẩn; nó gồm 2 dẫn xuất alanine và một axit amin đơn chức - hợp chất tương tự glutamate và được đặt tên là phosphinothricin. Họ xác định rằng phosphinothricin ức chế không thuận nghịch glutamine synthetase. Phosphinothricin lần đầu tiên được tổng hợp nhân tạo bởi các nhà khoa học ở Hoechst vào năm 1970 là một hỗn hợp racemic gọi là Glufosinate (Donn và Köcher, 2012).

Glufosinate là một loại thuốc trừ cỏ phổ rộng được sử dụng để kiểm soát các cỏ dại quan trọng như *Ipomoea* spp., *Sesbania bispinosa* (P. Mill.) McVaugh, *Polygonum pensylvanicum* L. và *Cyperus esculentus* L. tương tự như Glyphosate. Glufosinate được phun cho thực vật non ở giai đoạn phát triển ban đầu thì đạt hiệu quả cao. Nó được bán trong các công thức dưới nhãn hiệu như Glufosinate, Rely, Finale, Challenge và Liberty. Glufosinate được dán nhãn để kiểm soát hơn 120 cỏ dại lá rộng và cả cỏ kháng Glyphosate (Heap, 2010). Không có loại cỏ dại nào được báo

cáo chính thức là kháng Glufosinate. Glufosinate thường được sử dụng đặc thù trong 3 trường hợp như là một loại thuốc trừ cỏ: (i) phun trực tiếp để kiểm soát cỏ dại, bao gồm cả trên các cây trồng biến đổi gen; (ii) sử dụng như một chất làm khô cây trồng để thu hoạch thuận tiện (Monsanto, 2010); và (iii) Glufosinate có biểu hiện bảo vệ chống lại bệnh hại cây trồng khác nhau vì nó cũng có hoạt động diệt nấm và vi khuẩn khi tiếp xúc (Duke, 2014).

Phosphinothricin ức chế glutamine synthetase bằng cách bám vào vị trí của glutamate. Thực vật chết khi xử lý Glufosinate là do sự tích tụ amoniac và giảm pH trong màng thylakoid, dẫn đến không bắt cặp trong quá trình quang phosphoryl hoá (Duke, 2014). Việc không bắt cặp này sản sinh các dạng oxy hoạt hoá, peroxy hóa lipid và phá hủy màng tế bào (HRAC và WSSA, 2015).

1.5.1.2 Glyphosate

Glyphosate là thuốc trừ cỏ nội hấp, phổ rộng. Nó di chuyển khắp cây và giết chết bất kỳ thực vật không có biến đổi di truyền chống lại nó. Tên hóa học của Glyphosate là N (phosphonomethyl) glycine và tác dụng chính là ngăn chặn enzyme cần cho tổng hợp axit amin và protein. Khi enzyme bị ngăn chặn, thực vật sẽ chết trong vòng một vài ngày. Con đường chuyển hoá tương tự cũng được tìm thấy trong một số loại vi khuẩn và nấm, nhưng không có ở động vật (Kishore và Shah, 1988).

Glyphosate ban đầu được phát triển bởi một công ty dược phẩm, đặc tính trừ cỏ của nó đã được cấp bằng sáng chế cho Công ty Monsanto của Mỹ vào năm 1970 và nó được bán ra thị trường với tên thương mại là Roudrup từ năm 1973. Bằng sáng chế của công ty Monsanto hết hạn bên ngoài nước Mỹ vào năm 1991 và ở Mỹ vào năm 2000. Kể từ đó, các công ty thuốc trừ sâu khác đã đưa ra thị trường sản phẩm Glyphosate riêng của họ và hiện nay hàng trăm loại thuốc trừ cỏ chứa Glyphosate khác nhau đã được bán trên toàn thế giới (Monsanto, 2010).

Glyphosate giết chết thực vật bằng cách can thiệp vào quá trình tổng hợp các axít amin thơm như phenylalanine, tyrosine và tryptophan. Nó ức chế enzyme tổng hợp 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (*EPSPS*), enzyme này xúc tác phản ứng của shikimate-3-phosphate (S3P) và phosphoenolpyruvate thành 5-enolpyruvyl-

shikimate-3-phosphate (*EPSP*) (Steinrücken và Amrhein, 1980). *EPSPS* sau đó được khử phosphoryl hoá thành chorismate - một tiền chất thiết yếu cho các axit amin nói trên. Những axit amin này được sử dụng trong tổng hợp protein và để tạo các chất chuyển hóa thứ cấp như folate, ubiquinone và naphthoquinone. Các nghiên cứu tinh thể học về glyphosate và *EPSPS* chỉ ra rằng Glyphosate thực hiện chức năng bằng cách chiếm vị trí bám của PEP (phosphoenolpyruvate) - dạng trung gian của phức hợp cơ chất enzyme bậc 3. Glyphosate bị ức chế bởi enzyme *EPSPS* của các loài thực vật và vi khuẩn khác nhau ở mức độ khác nhau (Pollegioni và ctv, 2011). *EPSPS* chỉ có ở thực vật và vi sinh vật, gen mã hóa cho nó không có trong hệ gen động vật có vú (Funke và ctv, 2006).

Glyphosate được hấp thu chủ yếu qua lá, rất ít qua rễ và sau đó được vận chuyển đến các vị trí đang sinh trưởng. Do kiểu hoạt động này, nên nó chỉ có hiệu quả trên các thực vật đang sinh trưởng mạnh và không có hiệu quả trong việc ngăn chặn hạt giống nảy mầm hay cỏ dại tiền nảy mầm. Glyphosate giết chết rất hiệu quả nhiều loại thực vật, bao gồm các loại cỏ hoà thảo, cỏ lá rộng và cây thân gỗ. Về khối lượng, nó là một trong các chất trừ cỏ được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới hiện nay (Monsanto, 2010).

Mặc dù Glyphosate và các công thức như Roundup đã được các cơ quan quản lý trên toàn thế giới chấp nhận, mối quan tâm về tác động của chúng đối với con người và môi trường vẫn tồn tại (Myers và ctv, 2016; Cressey, 2015). Nhiều cuộc xem xét về quy định và học thuật đã đánh giá độc tính tương đối của Glyphosate như một chất trừ cỏ. Vào tháng 3 năm 2015, Cơ quan Nghiên cứu Quốc tế về Ung thư của Tổ chức Y tế Thế giới đã phân loại Glyphosate là "có thể gây ung thư ở người" (loại 2A) dựa trên nghiên cứu dịch tễ học, nghiên cứu trên động vật và nghiên cứu in vitro (Cressey, 2015). Ủy ban chung của WHO và FAO về dư lượng thuốc trừ sâu đã ban hành một báo cáo vào năm 2016 xác nhận rằng việc sử dụng các công thức Glyphosate không gây nguy hiểm cho sức khoẻ và cũng cho phép các giới hạn ăn vào hàng ngày được chấp nhận cho độc tính mãn tính (WHO/FAO, 2016). Thực tế, cho đến thời điểm này vẫn đang có nhiều tranh cãi về việc sử dụng thuốc trừ cỏ có chứa hoạt chất Glyphosate.

Tại Việt Nam, từ năm 2015 khi có những nghiên cứu và thông tin về mức độ độc

hại của Glyphosate tại châu Âu, Cục BVTV đã ngưng cấp phép đăng ký mới chất này. Sau phán quyết của tòa án Mỹ năm 2018, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã ban hành Quyết định 1186/QĐ-BNN-BVTV ngày 10-4-2019 về việc loại thuốc bảo về thực vật chứa Glyphosate ra khỏi danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam. Thông tư 10/2019/TT-BNNPTNT ngày 20/9/2019 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã liệt Glyphosate vào Danh mục thuốc bảo vệ thực vật cấm sử dụng tại Việt Nam. Sau khi cân nhắc, ngày 24 tháng 4 năm 2020, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn ban hành Thông tư 06/2020/TT-BNNPTNT về việc sửa đổi, bổ sung Điều 2 của Thông tư 10/2019/TT-BNNPTNT ngày 20/9/2019 và đã sửa đổi "Các thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất Glyphosate không được sản xuất, nhập khẩu; chỉ được buôn bán, sử dụng đến ngày 30/6/2021".

Glyphosate được sử dụng rộng rãi để kiểm soát cỏ dại tại khu vực Châu Á và chỉ có rất ít hoạt chất khác có thể được lựa chọn là giải pháp thay thế để trừ cỏ với hiệu quả và tính năng tương tự. Nếu không có cơ hội tiếp cận với các sản phẩm Glyphosate, nông dân phải kết hợp sử dụng nhiều biện pháp và sản phẩm khác nhau hoặc làm cỏ bằng tay, bằng máy. Những phương pháp kiểm soát cỏ dại thay thế này có tác động đáng kể bao gồm giảm hiệu quả kiểm soát cỏ dại, tăng mức độ sâu bệnh, khiến nông dân khó đi lại trên các cánh đồng và chi phí kiểm soát cỏ dại cao hơn (https://geneticliteracyproject.org/2017/02/14/without-glyphosate-farming-look-like/).

1.5.2 Gen kháng thuốc trừ cỏ

Để tạo tính kháng với Glyphosate, hầu hết các loại cây trồng kháng Glyphosate đều biểu hiện một loại *EPSPS* không nhạy cảm với Glyphosate có nguồn gốc từ *Agrobacterium* spp. Ngoài ra, nhiều loại cây trồng khác nhau cũng đã được chuyển với một trong hai gen vi khuẩn *pat* hoặc *bar* từ *Streptomyces* spp. tạo khả năng kháng thuốc trừ cỏ gốc glufosine. Những gen này mã hóa enzyme phosphinothricin acetyl transferase (PAT) có tác dụng giải độc l-PPT (phosphinothricin). Các gen chuyển khác có trong cây trồng HT tạo ra tính kháng với các chất ức chế ALS3 (gen gm-hra), 2,4-D (gen aad-1 và aad-12) hoặc Dicamba (gen *dmo*).

1.5.2.1 Enzyme EPSPS và gen CP4 EPSPS

Họ enzyme *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (*EPSPS*) hiện diện trong cây một lá mầm và vi sinh vật. Các enzyme *EPSPS* đã được phân lập từ cả 2 nguồn trên, những đặc tính của chúng đã được nghiên cứu một cách sâu rộng. Các enzyme này đơn chức năng có khối lượng phân tử 44 - 48 kD (Kishore và Shah, 1988). Protein *EPSPS* xúc tác quá trình chuyển hóa nhóm enolpyruvyl từ phosphoenol pyruvate (PEP) thành 5-hydroxyl của shikimate-3-phosphate (S3P) - liên quan đến hợp chất phosphate vô cơ dễ tiêu và 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (Donn và Köcher, 2012). Sản phẩm biến dưỡng 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate là sản phẩm cuối cùng trong con đường của axit shikimic. Axit shikimic là một cơ chất cho quá trình sinh tổng hợp các amino axit thơm (phenylalanine, tryptophan và tyrosine), lignin, các hợp chất flavonoid, các hợp chất phenolic cũng như các chất chuyển hóa thứ cấp khác là tetrahydrofolate, ubiquinone và vitamin K. Điều đặc biệt là con đường shikimate và các protein *EPSPS* vắng mặt trong động vật có vú, cá, chim, bò sát và côn trùng. Ngược lại, nó hiện diện trong các phân tử thơm nguồn gốc từ axit shikimic, chiếm tới 35% hoặc hơn sinh khối của thực vật (Donn và Köcher, 2012).

Gen *CP4 EPSPS* được phân lập từ *Agrobacterium* sp., chủng CP4, một loại vi khuẩn đất phổ biến. *EPSPS* đã được giải trình tự DNA và protein mã hóa *EPSPS* có khối lượng 47,6 kD, bao gồm một polypeptide đơn dài 455 axit amin. Protein CP4 *EPSPS* biểu hiện trong thực vật chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate với mức tương đương enzyme *EPSPS* thực vật nội sinh, ngoại trừ việc làm giảm mức độ giống nhau về cấu trúc với Glyphosate (Molin, 2017), là gen lý tưởng nhất trong họ *EPSPS* đã và đang được ứng dụng rộng rãi để tạo cây chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ.

Ở thực vật không chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate, Glyphosate bám vào enzyme *EPSPS* nội sinh và khóa quá trình sinh tổng hợp 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate, làm cho cây bị đói các axit amin thơm và các chất chuyển hóa thứ cấp thiết yếu (Molin, 2017). Thêm vào đó, hoạt tính của ezym *EPSPS* bắt nguồn từ việc

hình thành phức tam hợp của *EPSPS*-S3P-glyphosate. Sự hình thành phức hợp này xảy ra theo trật tự với việc bám của Glyphosate vào vị trí chỉ sau khi hình thành phức nhị hợp *EPSPS*-S3P. Việc bám của Glyphosate khóa hiệu quả sự bám của PEP và ngăn ngừa *EPSPS* xúc tác cho S3P và PEP. Tuy nhiên, sự giống nhau về cấu trúc CP4 *EPSPS* với PEP là cao hơn so với Glyphosate, vì vậy, CP4 *EPSPS* được ưu tiên bám vào PEP trong sự hiện diện của Glyphosate và xúc tác ngay tức khắc như không có mặt của Glyphosate (Molin, 2017). Sai khác trong sự thu hút việc bám của Glyphosate là cơ sở cho khả năng chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate ở thực vật được chuyển gen CP4 *EPSPS*.

Như đã biết, một số vi sinh vật có *5- enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthetase* (*EPSPS*) kháng với thuốc trừ cỏ Glyphosate. Phiên bản của enzyme mà vừa kháng với Glyphosate vừa vẫn đủ hiệu quả để điều khiển sự sinh trưởng thực vật thích hợp được xác định bởi các nhà khoa học Monsanto sau nhiều thử nghiệm trên vi khuẩn *Agrobacterium* chủng CP4 - được tìm thấy trong cột thải ở cơ sở sản xuất thuốc trừ cỏ Glyphosate (Green và Owen, 2011). Gen CP4*EPSPS* này đã được phân lập và chuyển vào cây đậu nành. Năm 1996, đậu nành biến đổi gen đã được trồng thương mại (James, 1997). Hiện tại, các cây trồng kháng Glyphosate như đậu nành, ngô, dầu cải, cỏ linh lăng, bông và lúa mì vẫn đang được phát triển. Cây trồng BĐG đã trở thành tiêu chuẩn ở Hoa Kỳ. Năm 2015, diện tích ngô, đậu nành và bông ở Mỹ được trồng giống biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ Glyphosate với tỷ lệ 89, 94 và 89% (USDA, 2015).

1.5.2.2 Enzyme PAT và gen bar

Cuối những năm 1980, các nhà khoa học đã phát hiện ra enzyme trong loài *Streptomyces* có thể gây bất hoạt có chọn lọc đối với phosphinothricin tự do; gen mã hóa enzyme được phân lập từ *Streptomyces hygroscopicus* kháng bialaphos (gen *bar*) và gen mã hóa enzyme được phân lập từ *Streptomyces viridochromeogenes* là *phosphinothricin acetyltransferase* (gen *PAT*). Hai gen và protein của chúng có mức độ tương đồng 80% về DNA và tương đồng 86% về axít amin, cùng mã hoá cho 158 axit amin (Donn và Köcher, 2012).

Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền chuyển các gen *bar* hoặc *PAT* từ *Streptomyce*s vào những giống cây trồng thích hợp (Donn và Köcher, 2012; Green và Castle, 2010). Năm 1995, cây trồng kháng Glufosinate đầu tiên là cải dầu đã được đưa ra thị trường, tiếp theo sau là ngô (năm 1997), bông (năm 2004) và đậu nành (năm 2011) (Irby và ctv, 2013).

Tính đến 2011, có 38 sự kiện chuyển gen *bar* hay *PAT* ở 8 loại cây trồng đã được chấp thuận cho thương mại hóa ở 11 nước, bao gồm củ cải đường, cải dầu, đậu nành, bông, lúa, ngô… Trong đó, cây bông chuyển gen *bar* (LLCotton25) được Công ty Bayer thương mại hóa lần đầu vào năm 2004 ở Mỹ. Bên cạnh đó, sự kiện của Công ty Dow AgroSciences sử dụng gen *bar* như chỉ thị chọn lọc (Widestrike cotton) cũng đã được chấp thuận để kiểm soát cỏ dại (Irby và ctv, 2013).

1.6 Chuyển gen thực vật qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens*

Có nhiều phương pháp chuyển gen đã được nghiên cứu và áp dụng để chuyển gen ngoại lai vào tế bào, mô thực vật. Tùy thuộc vào đối tượng thực vật, loại vector biến nạp, điều kiện phòng thí nghiệm... mà các nhà nghiên cứu có sự lựa chọn phương pháp chuyển gen thích hợp. Nói chung, kỹ thuật chuyển gen thực vật được chia làm hai nhóm là chuyển gen gián tiếp và chuyển gen trực tiếp. Ở nhóm gián tiếp, gen được chuyển vào tế bào, mô thực vật qua một vi sinh vật trung gian, bao gồm các phương pháp: (1) Chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* và (2) Chuyển gen gián tiếp nhờ virus. Ở nhóm thứ 2 (trực tiếp), gen được chuyển trực tiếp vào tế bào, mô thực vật thông qua những thiết bị, hoặc thao tác nhất định. Bao gồm các phương pháp: (1) Bắn gen (bombardment hay gene gun, biolistic); (2) Xung điện (electroporation); (3) polyethylene glycol (PEG); (4) Siêu âm (ultrasonic); (5) Vi tiêm (microinjection) và (6) Qua đường ống phấn (pollen tube pathway).

1.6.1 Vi khuẩn *A. tumefaciens* và hiện tượng biến nạp gen ở thực vật

A. tumefaciens là vi khuẩn đất, có khả năng xâm nhiễm và gây bệnh, kích thích tạo khối u ngay tại vết thương của cây chủ. Trong tự nhiên *A. tumefaciens* chủ yếu tấn công cây 2 lá mầm. Hoàn toàn khác với mô tế bào thực vật bình thường, khối u do *A. tumefaciens* sinh ra phát triển mạnh trong điều kiện thiếu hormon sinh trưởng.

Đó là do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn T-DNA (Transfer DNA) sang tế bào thực vật và T-DNA điều khiển quá trình sinh tổng hợp các hormon sinh trưởng. Ngoài ra, các khối u cũng sinh tổng hợp các opin là các axit amin, các dẫn xuất của đường. Phụ thuộc vào từng chủng *A. tumefaciens* mà dạng opin tổng hợp được có thể là nopalin, octopin, agrocinopin, mannozapin và agropin, Trong đó, nopalin và octopin là hai dạng phổ biến. Opin được vi khuẩn sử dụng thay cho nguồn carbon và nitơ nhờ hoạt động của gen chuyển hóa opin trên plasmid gây khối u thực vật. Cơ chế phân tử của sự hình thành khối u đã được quan tâm nghiên cứu nhằm tìm ra phương thức phòng bệnh cho cây. Khi phát hiện ra Ti-plasmid và khả năng tự chuyển T-DNA vào genome thực vật, người ta đặc biệt chú ý và khai thác khả năng sử dụng chúng như một vector tự nhiên để chuyển các gen quan tâm vào thực vật nhằm tạo ra những cây trồng mang những tính trạng mọng muốn (Trần Quốc Dung và ctv, 2006).

Quá trình biến đổi gen thực vật qua trung gian *A. tumefaciens* đòi hỏi phải có sự hiện diện của hai thành phần di truyền định vị trên Ti-plasmid. Thành phần thiết yếu đầu tiên là T-DNA, được nhận diện bởi chuỗi biên bảo tồn 25bp ở 2 đầu. Thứ hai là vùng độc lực (vir), bao gồm ít nhất bảy locus chính (virA, virB, virC, virD, virE, virF, và virG) trong hệ protein vi khuẩn làm trung gian cho quá trình xâm nhiễm và truyền T-DNA của vi khuẩn. *Vir*A và *Vir*G là protein điều hòa, hoạt hóa biểu hiện của các gen vir khác trên Ti-plasmid. *Vir*B, *Vir*C, *Vir*D, *Vir*E và *Vir*F tham gia vào quá trình chuyển và tích hợp T-DNA từ *A. tumefaciens* vào tế bào thực vật (Hwang và ctv, 2017).

1.6.2 Vector biểu hiện ở thực vật

Trong ứng dụng thực tế, T-DNA được tạo ra theo hai bước trước khi sử dụng để chuyển gen quan tâm vào thực vật: (i) nhân dòng trực tiếp gen đích vào vùng T-DNA của plasmid Ti và (ii) tạo vector nhị phân. Vector nhị phân bao gồm vùng hỗ trợ (Helper plasmid) và vùng mang gen đích hoạt động đồng thời để chuyển gen. Vùng hỗ trợ chứa các gen *vir* và vector nhị phân có bộ khung từ các vector nhân dòng *E. coli* mang gen đích nằm giữa biên phải và biên trái của T-DNA (Meyers và ctv, 2010).

Vector pBIN19 là vector chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* đầu tiên do Bevan thiết kế và đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng vì Bevan cung cấp miễn phí cho người dùng học thuật. pBIN19 đã hoạt động khá tốt và hiện tại vẫn được sử dụng rộng rãi. Đây là vector chuyển gen được sử dụng rộng rãi nhất (Rao và ctv, 2016).

Sử dụng *A. tumefaciens* tạo cây chuyển gen cần phải được khắc phục một số trở ngại. Đầu tiên, các gen gây khối u từ T-DNA dạng nguyên thủy được loại bỏ để loại bỏ khả năng gây bệnh của vi khuẩn mà không ảnh hưởng đến khả năng truyền T-DNA của nó. Thứ hai, gen quan tâm và gen chọn lọc cho cây chuyển gen cần được đưa vào T-DNA và các công cụ sinh học phân tử là cần thiết để nhân bản DNA *in vitro*. Kích thước Ti-plasmid lớn và thường có số lượng bản sao thấp khiến cho việc phân lập và nhân dòng khá khó khăn. Để khắc phục những khó khăn này, hầu hết các nhóm nghiên cứu sử dụng vector nhị phân, trong đó vùng T-DNA chứa trình tự khởi đầu sao chép của loài có khả năng nhân bản plasmid nhiều và các gen *vir* cần cho chuyển T-DNA trên Ti -plasmid (Hwang và ctv, 2017). Vector nhị phân này đã cung cấp cho cộng đồng nghiên cứu thực vật và đã tạo ra sự bùng nổ trong việc tạo cây chuyển gen.

Với những tiến bộ trong công nghệ DNA tái tổ hợp, các vector nhị phân T-DNA đã phát triển trong những năm qua và được phát triển chuyên biệt hơn cho các mục đích khác nhau (Hwang và ctv, 2017). Các vector nhị phân dựa trên T-DNA thường có một số đặc điểm, bao gồm (1) các chuỗi biên phải và trái dùng để xác định vùng T-DNA; (2) các gen đánh dấu chọn lọc ở vi khuẩn (*E. coli* và *A. tumefaciens*) và ở thực vật; (3) các vị trí endonuclease giới hạn trên T-DNA cho phép chèn một hoặc nhiều gen quan tâm; (4) điểm khởi đầu sao chép để plasmid nhân lên trong vi khuẩn.

Trình tự hoàn chỉnh của pBIN19 đã được thực hiện bởi Frisch và ctv, 1995. Phiên bản cải tiến pBIN20 có nhiều vị trí cắt giới hạn hơn tại vùng đa điểm cắt (MCS) do Hennegan và ctv thực hiện năm 1998. Trong nhiều loại vector chuyển gen vào thực vật, vector pCAMBIA được sử dụng rộng rãi để chuyển gen trên cây một lá mầm. Tính kháng kanamycin (*neomycin phosphotransferase* II) hoặc tính chống chịu thuốc trừ cỏ

bialaphos (*bar*) hoặc gen chỉ thị như protein biểu hiện màu xanh lá *beta-glucuronidase* (*GUS*), huỳnh quang (*GFP*) được sử dụng phổ biến trong chọn lọc tế bào/mô/cây chuyển gen (Rao và ctv, 2016).

Các vector biểu hiện thực vật pRT và được phát triển bởi Töpfer và ctv, có trình tự điều khiển (promoter) phiên mã là CaMV 35S (từ virus gây bệnh khảm súp lơ) và tín hiệu kết thúc phiên mã là CaMV polyA. Các plasmid pART7 và pART27 có MCS chứa nhiều trình tự nhận biết duy nhất của các enzyme giới hạn, giúp dễ dàng gắn gen mục tiêu vào vector. MCS nằm giữa promoter CaMV35S và tín hiệu kết thúc polyA OCS của plasmid pART7, như vậy, trình tự mã hóa của gen mục tiêu được nhân dòng trong MCS. *Not*I (trình tự nhận biết 8bp) được sử dụng để cắt cả vector và gen mục tiêu, sau đó gen mục tiêu được gắn vào vị trí *Not*I của pART27. Trong vector pART27, gen *npt*II được đặt ở phía LB để đảm bảo chọn được thể chuyển gen. Zapata và ctv đã báo cáo việc sử dụng các vector pGU4AG*bar* và pGBIU4Ag*bar* tạo ra hai mươi dòng lúa mì đông chuyển gen biểu hiện protein chịu lạnh (*Galanthus nivalis agglutinin*: *GNA*) bằng phương pháp chuyển gen qua đường ống phấn. Phương pháp này xác nhận rằng toàn bộ T-DNA chứa gen mục tiêu có mặt trong các cây chuyển gen khi chọn lọc bằng kanamycin (Hwang và ctv, 2017).

1.6.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen

Nhiều yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen, bao gồm nhiệt độ tăng trưởng thực vật, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi cấy vi khuẩn và thực vật, cường độ và thời gian chiếu sáng, nồng độ AS bổ sung, tiền xử lý bằng phytohormon, kiểu gen thực vật, chủng *A. tumefaciens* và các yếu tố khác (Gelvin, 2005; Zambre và ctv, 2003). Trong quá trình đồng nuôi cấy rễ *A. thaliana* với *A. tumefaciens*, hiệu suất chuyển gen và tần số phục hồi của cây ở 25 ^{o}C cao hơn tương đối so với tần số này ở 21 ^{o}C (Vergunst và ctv, 2005). Mặc dù *A. tumefaciens* phát triển tốt ở 28 ^{o}C, nhưng sự tích lũy protein VirB ảnh hưởng đến khả năng truyền T-DNA cũng như độc lực trên ký chủ *Kalanchoe* bị tác động mạnh ở nhiệt độ 25 ^{o}C (*Bar*on và ctv, 2001); dữ liệu còn chỉ ra rằng, tiền cảm ứng với AS nên được thực hiện ở 19 – 21 ^{o}C. Hơn nữa, *A. tumefaciens* mất độc lực khi nuôi ở 37 ^{o}C do mất plasmid Ti trong vi khuẩn

(Hamilton và Fall, 1971). Điều kiện ánh sáng trong quá trình chuyển gen thực vật qua trung gian *Agrobacterium* cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chuyển gen. Hiệu suất biến nạp cao hơn dưới ánh sáng liên tục so với chu kỳ ánh sáng 16 giờ/tối 8 giờ (Vergunst và ctv, 2005; Zambre và ctv, 2003). Một yếu tố quan trọng khác để có được tần số biến nạp cao là bổ sung 50 – 200 mM AS (phân tử tiết ra từ vết thương tự nhiên) trước hoặc trong giai đoạn đồng nuôi cấy để tăng cường biểu hiện gen độc lực ở vi khuẩn (Vergunst và ctv, 1998). Người ta cũng đề xuất rằng, thời gian đồng nuôi cấy không nên vượt quá hai ngày để tránh sự phát triển quá mức của vi khuẩn (Gelvin, 2005; Vergunst và ctv, 1998). Sau khi đồng nuôi vi khuẩn và mẫu biến nạp, các loại kháng sinh khác nhau, như carbenicillin, cefotaxime, vancomycin hoặc timentin có thể được thêm vào môi trường chọn lọc để loại bỏ *A. tumefaciens*. Kháng sinh timentin, ticarcillin và chất ức chế lactamase là clavulanate kali thường được sử dụng trong chuyển gen vào rễ *A. thaliana* (Niazian và ctv, 2017; Vergunst và ctv, 1998).

Các chủng *A. tumefaciens* dạng opine khác nhau cho mức độ độc lực khác nhau đối với các loài thực vật khác nhau, một phần là do các gen *tzs* và *vir*F chỉ tồn tại trong một dạng Ti-plasmid. Các chủng *A. tumefaciens* dạng nopaline thích hợp để chuyển gen *A. thaliana* và các cây họ Brassicaceae (Gelvin, 2000; Hwang và ctv, 2013). Hơn nữa, khả năng tái sinh của một số kiểu gen *A. thaliana* có thể được tăng cường khi thực hiện trước bước nuôi cấy trên môi trường chứa auxin và cytokinin (Niazian và ctv, 2017). Các chủng *A. tumefaciens* cải biến ảnh hưởng đáng kể đến phạm vi ký chủ của vi khuẩn và hiệu quả chuyển gen của các loài thực vật khác nhau (Hwang và ctv, 2010).

Mẫu rễ là một trong những mô thực vật thường được sử dụng để biến đổi gen *A. thaliana*. Có một số lợi thế trong chuyển gen vào mẫu rễ qua trung gian *A. tumefaciens*. Biến nạp vào mẫu rễ *A. thaliana* có xu hướng chèn T-DNA sợi đơn cao hơn khi so sánh với biến nạp đĩa lá (Hwang và ctv, 2017). Một số phương pháp chuyển trung gian *Agrobacterium* cho *A. thaliana* đã được phát triển và sử dụng nhiều kiểu gen *A. thaliana*, loại mô, chủng vi khuẩn, vector và chỉ thị chọn lọc (Niazian và ctv, 2017). Một số nghiên cứu đã sử dụng kết quả chuyển gen vào mẫu rễ để xác định

độc lực của các chủng *A. tumefaciens* khác nhau và hiệu quả chuyển gen trên từng kiểu gen *A. thaliana*. Dựa trên các kết quả thu được từ các thử nghiệm chuyển gen vào mẫu rễ này, các protein của vi khuẩn và thực vật có liên quan đến quá trình chuyển gen thực vật qua trung gian *Agrobacterium* được xác định và mô tả (Hwang và ctv, 2013).

Nhược điểm của phương pháp chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* bao gồm: (i) yêu cầu điều kiện vô trùng cao, (ii) tốn thời gian, (iii) phát sinh đột biến soma, (iv) tính đặc hiệu của kiểu gen, (v) tính trơ của tế bào, (vi) thất bại trong quá trình thuần hóa của cây biến chuyển gen có giá trị trong quá trình ra cây tái sinh (Mayavan và ctv, 2013), (vii) tác động có hại của kháng sinh chọn lọc như kanamycin đối với sự ra rễ của cây GM (Tohidfar và ctv, 2008), (viii) vì các nhà nghiên cứu khác nhau có thể sử dụng giống cây khác nhau, do đó xác định giống và kỹ thuật thích hợp là cần thiết (Niapour và ctv, 2013). Vì những bất lợi này, cây GM tái sinh thông qua nuôi cấy mô, ứng dụng thương mại của cây chuyển gen cần có đánh giá nguy cơ do đột biến soma (Hwang và ctv, 2017).

1.7 Chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* trên cây bông

Bông (*Gossypium* spp.) là cây trồng kinh tế rất quan trọng, cung cấp nguồn lực cơ bản cho hàng ngàn sản phẩm tiêu dùng và sản phẩm công nghiệp trên toàn thế giới, tiếp tục đóng góp vào sự tăng trưởng của ngành công nghiệp sợi và thực phẩm. Tuy nhiên, người trồng bông luôn phải đối mặt với một số thách thức nghiêm trọng như sâu bệnh hại và cỏ dại dẫn đến thiệt hại kinh tế đáng kể (Sattar và ctv, 2013; Zhang và ctv, 2016). Do đó, điều quan trọng là phải cải thiện hiệu suất nông học của bông và đặc biệt là tăng cường khả năng kháng côn trùng, bệnh hại cũng như tăng khả năng chống chịu tuốc trừ cỏ, tăng chất lượng và năng suất bông xơ.

Sự phát triển của các kỹ thuật chuyển gen cho bông trong 3 thập kỷ qua đã góp phần cải thiện tính kháng côn trùng, chống chịu thuốc trừ cỏ, chất lượng xơ và năng suất (Zhang, 2013). Mặc dù bông chuyển gen được tạo lần đầu tiên cách đây hơn 30 năm (Firoozabady và ctv, 1987; Umbeck và ctv, 1987), việc chuyển gen bông vẫn rất

khó khăn, không thực sự hiệu quả và tốn thời gian so với các loại cây trồng khác như lúa, lúa mì và cà chua (Bajwa và ctv, 2015; Zhang, 2013). Chuyển gen qua trung gian vi khuẩn là phương pháp được ưa thích để đưa gen chuyển vào cây bông, tuy nhiên, vẫn còn đáng kể những hạn chế trong quy trình chuyển gen.

Nghiên cứu chuyển gen tạo cây bông biến đổi gen đã được tiến hành từ khá lâu. Cũng như các cây trồng khác, có nhiều phương pháp chuyển gen đã được tiến hành trên cây bông. Tuy nhiên, các phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*, chuyển gen trực tiếp bằng bắn gen, chuyển gen vào protoplast bằng kỹ thuật xung điện hoặc PEG và phương pháp chuyển gen thông qua đường ống phấn là các phương pháp đang được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trên thế giới (Zhang, 2013).

1.7.1 Phương pháp chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens*

Chuyển gen gián tiếp vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* là phương pháp đơn giản và hiệu quả, là phương pháp chính được sử dụng để tạo cây bông biến đổi gen. Chuyển gen gián tiếp vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* được báo cáo lần đầu tiên bởi 2 nhóm Firoozabady và cộng sự (1987) và Umbeck và cộng sự (1987). Kể từ đó, mười tám bằng sáng chế của Mỹ đã được cấp về nghiên cứu chuyển gen và tái sinh cho cây bông.

Umbeck và cộng sự (1987) đã chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* vào các mô thân dưới lá mầm của giống bông Coker310, sau đó các mẫu mô này được đặt lên trên môi trường cảm ứng mô sẹo (chứa 0,1 mg/L Kinetin và 0,1 mg/L 2,4-D) có bổ sung 50 mg/L kanamycin để chọn lọc các mô sẹo chuyển gen. Các mô sẹo hình thành và sinh trưởng trên môi trường chọn lọc sau thời gian 4 – 6 tuần được cấy chuyển tiếp lên môi trường chọn lọc không chứa hormon sinh trưởng. Việc cấy chuyển lặp lại liên tục trên môi trường không chứa hormon sinh trưởng làm phát sinh phôi và các phôi nảy mầm trên môi trường Stewart và Hsu.

Firoozabady và cộng sự (1987) đã sử dụng mô lá mầm của giống bông Coker 210 để chuyển gen, các loại mẫu mô này có diện tích tiếp xúc với vi khuẩn lớn hơn và tiếp xúc với môi trường rộng hơn, nên tăng hiệu quả chuyển gen. Mô sẹo được cảm ứng trên môi trường chứa 0,1 mg/L NAA và 5 mg/L 2iP trong thời gian 2-3 tuần

và sau đó, các mô sẹo được cấy chuyển lên môi trường MS cơ bản để phát sinh phôi. Phôi đã nảy mầm trên môi trường nồng độ auxin thấp 0,1 mg/L NAA và 0,1 mg/L GA_3. Khoảng 85 – 90% các mẫu mô tạo thành mô sẹo trên môi trường chọn lọc và 95 – 100% trong số này kháng với kanamycin (Firoozabady và ctv, 1987).

Nhiều yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen đã đã được báo cáo, thời gian nhiễm có hiệu quả trong khoảng từ 5 giây đến 30 phút (Sumithra và ctv, 2010; Wamiq và ctv, 2017), nhưng trong hầu hết các nghiên cứu, tỷ lệ chuyển chuyển gen cao hơn khi nhiễm lâu hơn 10 phút. Mặc dù thời gian đồng nuôi cấy với vi khuẩn tối ưu là rất quan trọng để chuyển gen trong một số cây trồng, nhưng trong trường hợp bông, nó không khác biệt trong khoảng từ 36 đến 72 giờ (Leelavathi và ctv, 2004; Sunilkumar và Rathore, 2001). Jin và cộng sự (2005) cho rằng đồng nuôi ở 19 ^{o}C trong 48 giờ có hiệu quả nhất (Jin và ctv, 2005) và cũng đã được xác nhận trước đó bởi Sunilkumar và Rathore (2001). Nghiên cứu chi tiết về chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* cho cây bông của Sunilkumar và Rathore (2001) đã chứng minh rằng, một số yếu tố then chốt như acetosyringone trong môi trường đồng nuôi cấy, đồng nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ thấp 21 ^{o}C, kích thước mẫu mô sẹo lớn hơn góp phần làm cho tỷ lệ sống sót của mô sẹo trên môi trường chọn lọc cao hơn. Hơn nữa, tiền nuôi cấy trong hai tuần trên môi trường có nồng độ cytokinin cao và nồng độ auxin thấp giúp cải thiện sự sống sót của mô sẹo, mặc dù việc xử lý này làm chậm quá trình phát sinh phôi (Sunilkumar và Rathore, 2001).

Bên cạnh việc chuyển gen vào mô cây bông và huyền phù phát sinh phôi, thì các mô phân sinh cũng được chuyển gen gián tiếp qua trung gian *Agrobacterium* (Gould và ctv, 1991). Các mô phân sinh chuyển gen được chọn lọc trên môi trường có bổ sung kinetin (hoặc BA) và NAA để thu được các cây có rễ khỏe hoặc các cây được ghép lên thân cây có rễ khác. Do các mô phân sinh không phản phân hóa, nên pha mô sẹo và biến dị soma không tồn tại. Phương pháp này có thuận lợi là không phụ thuộc vào kiểu giống; nhanh chóng và cũng có một số sự gắn gen chuyển. Bất lợi chủ yếu là tốn công lao động và thể mang gen thường ở dạng khảm. Hiệu quả gắn

gen chuyển và phản ứng của các mẫu mô cao hơn nhiều so với chuyển gen vào mô phân sinh.

Cho đến nay, tái sinh *in vitro* cây bông chỉ quan sát được ở các kiểu gen Coker-312, 310, 201 và 315 (*Gossypium hirsutum*) có nguồn gốc Hoa kỳ (Jadhav và Katageri, 2017). Trong hầu hết các nghiên cứu, chủ yếu sử giống Coker312 (giống thuần được sử dụng phổ biến trong canh tác) cho chuyển gen. Phương pháp qua trung gian *A. tumefaciens* bao gồm quá trình nuôi cấy mô phức tạp, do đó gặp phải các vấn đề liên quan đến phôi soma như thể khảm (Sumithra và ctv, 2010), chất lượng phôi soma kém (Jin và ctv, 2005), thay đổi tế bào học và bất thường về kiểu hình (Sunilkumar và Rathore, 2001). Những khó khăn gặp phải về thời gian tái sinh, khả năng tái sinh và biến dị soma thường thấy xuất hiện trong thời gian nuôi cấy kéo dài. Phần lớn các tế bào trên bề mặt cắt của mẫu mô được chuyển gen, nhưng rất ít trong số chúng được nhận thấy có khả năng phát sinh hình thái cơ quan. Mỗi mẫu mô sẹo là kết quả của một sự kiện chuyển gen riêng lẻ, nên cần phải nuôi cấy riêng biệt trong quá trình nhân lên và cảm ứng sự phát sinh phôi soma. Sự nảy mầm của các phôi và ra rễ của các cây tái sinh cũng rất kém hiệu quả, nên làm giảm hiệu quả của quá trình. Hơn nữa, hầu hết các giống bông rất khó để tái sinh trong nuôi cấy mô. Do đó, phương pháp bị giới hạn trong các giống Coker hoặc liên quan đến Coker. Thông thường, các giống chuyển gen ưu tú được tạo bằng cách hồi giao các dòng Coker chuyển gen với các giống khác (Jadhav và Katageri, 2017).

Các khó khăn về quy trình nuôi cấy mô đề cập ở trên đã được khắc phục một phần bằng việc sử dụng các mô sẹo phát sinh phôi có khả phát sinh phôi tốt như là nguồn mẫu mô cho chuyển gen. Các mô sẹo phát sinh phôi có khả năng tái sinh được tìm thấy là một quần thể hỗn hợp các tế bào mô phân sinh, tế bào tiền phát sinh phôi và phôi hình cầu. Hầu hết các tế bào mô sẹo chuyển gen gián tiếp qua trung gian *A. tumefaciens* này có thể được tái sinh thành cây khi được nuôi cấy trong các điều kiện đa lượng và vi lượng thích hợp. Leelavathi và ctv (2004) đã báo cáo nghiên cứu chuyển gen *Bt* (*cry*1Ia5) vào giống bông Coker310 bằng phương pháp chuyển gen vào mô sẹo phát sinh phôi. Mô sẹo bông có các tế bào tiền phát sinh phôi đã được

lây nhiễm *A. tumefaciens*, sau đó đặt lên giấy lọc phủ trên môi trường chọn lọc và dán kín bằng băng dán vi lỗ. Hàm lượng dinh dưỡng thấp cũng như việc làm khô do giấy lọc đã kích thích các mô sẹo phát sinh phôi. Mỗi mô sẹo này được nhân lên riêng lẻ trên môi trường tương tự nhau và sau đó phôi được nảy mầm trên môi trường trưởng thành phôi. Hầu hết các phôi nảy mầm hình thành cây có rễ hữu dụng. Trung bình có 75 cụm phôi hình cầu được quan sát thấy trên một đĩa chọn lọc, trung bình 12 cây tái sinh/1đĩa petri mô sẹo đồng nuôi cấy. Khoảng 83% cây tái sinh mang gen khi phân tích Southern blot. Phương pháp này đơn giản, đáng tin cậy, hiệu quả và ít tốn công lao động hơn bất kỳ phương pháp hiện hành khác để chuyển gen bông (Leelavathi và ctv, 2004).

Quy trình đã mô tả ở trên minh chứng rằng, các mô sẹo phát sinh phôi cung cấp một lượng lớn các tế bào có khả năng tái sinh cho chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens*. Các stress về dinh dưỡng và thiếu nước xảy ra ở giai đoạn chọn lọc phôi soma chuyển gen, nên góp phần làm cho tần số chuyển gen cao. Tần số chuyển gen cao xảy ra cùng với việc giảm thời gian nuôi cấy 3 – 5 tháng khi so với phương pháp chuyển gen thông thường.

Một cách khác nữa khắc phục những khó khăn trong nuôi cấy mô sẹo là phương pháp chuyển gen sử dụng đỉnh chồi do Gould và Magallanes (1998) phát triển. Phương pháp này rất thuận tiện vì nó sử dụng cây con mới nảy mầm làm nguồn nguyên liệu chuyển gen (mô phân sinh đỉnh phát triển rất nhanh và diễn ra quá trình nguyên phân liên tục) nên không cần nuôi cấy phôi soma và tránh được nguy cơ đột biến soma trong nuôi cấy mô kéo dài (Li và ctv, 2001). Một số dòng bông biến đổi gen đã được tạo ra bằng phương pháp chuyển gen vào đỉnh chồi (Arun và ctv, 2015). Quy trình chuyển gen cũng sử dụng môi trường chuyên biệt để đồng nuôi cấy, chọn lọc và ra rễ. Tuy nhiên, điều kiện vô trùng vẫn là cần thiết trong quá trình chuyển gen vào đỉnh chồi đến khi cây ra rễ đủ để chuyển sang điều kiện đất.

1.7.2 Tình hình nghiên cứu chuyển gen cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* ở Việt Nam

Ở Việt Nam, nghiên cứu chuyển gen cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* bắt đầu từ 2001 (Lê Trần Bình và Lê Thị Muội, 2005). Nhóm nghiên cứu bao gồm một số thành viên của Viện Công nghệ sinh học và Viện nghiên cứu bông và Phát triển Nông nghiệp Nha Hố đã nghiên cứu phân lập, thiết kế vector và chuyển gen *Bt* kháng sâu *Cry*IAc, gen chức năng chịu hạn *P5CS* để chuyển vào cây bông. Tuy nhiên, kết quả dừng ở mức xây dựng được quy trình tái sinh thông qua tạo phôi soma cho giống SSR60 và bước đầu xây dựng được quy trình chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* cho giống này, nhưng chưa tạo được cây bông chuyển gen.

Ứng dụng kết quả nghiên cứu của Umbeck và cộng sự (1987) và Firoozabady và cộng sự (1987), kế thừa kết quả nghiên cứu của (Lê Trần Bình và Lê Thị Muội, 2005), nhóm nghiên cứu của Viện nghiên cứu bông và phát triển Nông nghiệp Nha Hố đã nghiên cứu xây dựng được quy trình tái sinh thông qua tạo phôi soma cho 2 giống SSR60F và Coker312 (Trịnh Minh Hợp và ctv, 2006); xây dựng được quy trình chuyển gen *Cry*IAc vào 2 giống này bằng chuyển gen gián tiếp qua trung gian *A. tumefaciens* (Trịnh Minh Hợp và ctv, 2013). Quy trình có thông số thích hợp cho chuyển gen chủng LBA4404, gồm: nồng độ hygromycin cảm ứng mô sẹo chuyển gen là 12,5 mg/L và nhân mô sẹo chuyển gen là 10 mg/L; nồng độ cefotaxime ức chế *A. tumefaciens* là 500 mg/L; mật độ tế bào OD_{600} 0,35 và thời gian nhiễm *A. tumefaciens* 5 – 10 phút; thời gian đồng nuôi cấy 48 giờ; và nhiệt độ đồng nuôi cấy 21 ^{o}C. Áp dụng quy trình để chuyển gen *Cry*IAc vào 2 giống bông Coker312 và SSR60F, đã tạo được 12 cây chuyển gen thế hệ T_0. Trong quy trình, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo chuyển gen là 25,4% (Coker312) và 24,9% (SSR60F); tỷ lệ mô sẹo sống sót và nhân lên là 11,5% (Coker312) và 11,1% (SSR60F); và tỷ lệ phát sinh phôi là 1,09% (Coker312) và 1,06% (SSR60F). Sàng lọc, đánh giá cây chuyển gen T_0, đã thu được 7 dòng bông chuyển gen đồng thời mang gen *hpt* kháng hygromycin, *Cry*IAc và có tính kháng sâu xanh, với tỷ lệ giết sâu 44 – 70% (Trịnh Minh Hợp, 2012; Trịnh Minh Hợp và ctv, 2013).

Nhóm nghiên cứu của Viện nghiên cứu bông và phát triển Nông nghiệp Nha Hố Kết hợp với nhóm của Viện Di truyền Nông nghiệp đã phân lập và thiết kế được vector tái tổ hợp mang gen điều khiển chịu hạn *DREB2ACA* và gen chức năng chịu hạn *Gal* (Lê trọng Tình và ctv, 2014); xây dựng được quy trình chuyển gen điều khiển chịu hạn *DREB2ACA* vào giống SSR60F và Coker312 bằng chuyển gen gián tiếp qua trung gian *A. tumefaciens*, trong quy trình, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo chuyển gen 21,8 – 32,2% và tỷ lệ phát sinh phôi chuyển gen 0,87 – 1,27% (Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014); đã xây dựng được quy trình chuyển gen chức năng chịu hạn $P5CS_M$ vào giống Coker312 bằng chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens*, với tỷ lệ cảm ứng mô sẹo chuyển gen 73,4 – 76,8% và tỷ lệ phát sinh phôi chuyển gen 8,4 – 9,47%; và đã tạo được 3 dòng D2, D3 và D40 có khả năng chịu hạn làm vật liệu cho chương trình chọn tạo giống bông trong nước (Lê trọng Tình và ctv, 2014).

Mặc dù, các kết quả nghiên cứu chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* ở Việt Nam thời gian qua đã thành công, làm cơ sở khoa học vững chắc cho nghiên cứu chuyển gen tạo giống bông chống chịu với ngoại cảnh bất lợi, sâu bệnh hại và kháng thuốc trừ cỏ. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu này còn tồn tại những khó khăn mà các nghiên cứu trên thế giới cũng gặp phải, đó là tỷ lệ cảm ứng và nhân mô sẹo chuyển gen thấp, tỷ lệ phân hoá phôi và tái sinh cây chuyển gen rất thấp, đặc biệt, là tỷ lệ cây chuyển gen dị dạng rất cao. Những khó khăn được chú ý và khắc phục trong nghiên cứu này.

Hiệu quả chuyển gen phụ thuộc chặt chẽ với tỷ lệ tái sinh cây trong quy trình nuôi cấy mô, trong đó yếu tố giống có vai trò then chốt. Do việc tái sinh cây bông phụ thuộc kiểu gen, hầu hết các nghiên cứu chuyển gen bông ở Việt Nam đều tiến hành trên giống Coker312 (Trịnh Minh Hợp, 2012; Trịnh Minh Hợp và ctv, 2013; Lê Trọng Tình và ctv, 2014; Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014). Ở Việt Nam, các giống bông nhóm Coker không phù hợp với canh tác vì bị nhiễm rầy xanh (*Amrasca devastans* Distant) ở mức nặng và thông thường các dòng chuyển gen tạo ra được sử dụng làm vật liệu lai tạo với các giống chống chịu rầy xanh. Hiện Coker310 được sử dụng trong một số cặp lai triển vọng có khả năng chống chịu rầy xanh (Trần Thanh Hùng và ctv,

2011), vì vậy, việc xây dựng quy trình tái sinh hiệu quả, nâng cao tỷ lệ chuyển gen là cần thiết. Năm 2014, Nguyễn Thị Nhã và cộng sự tiến hành tái sinh giống Coker310 từ các loại mẫu lá mầm, thân mầm và rễ mầm (Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014). Đây là cơ sở cho việc mở rộng các nghiên cứu nhằm nâng cao tỷ lệ tái sinh cây giúp cải thiện hiệu quả chuyển gen vào cây bông cũng như đa dạng các giống chuyển gen ở Việt Nam.

Tóm lại:

Phương pháp chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* được sử dụng phổ biến, tuy nhiên cần cải thiện những bất lợi do nuôi cấy mô gây ra. Trong phương pháp này cần có hai quy trình tối ưu hóa: (i) tối ưu hóa các tham số trong quy trình nuôi cấy mô, chẳng hạn như tập trung vào các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, kiểu gen cây trồng, loại mô nghiên cứu,... và (ii) tối ưu hóa các tham số trong quy trình chuyển gen như chủng *A. tumefaciens*, nhiệt độ và thời gian đồng nuôi cấy, loại và nồng độ kháng sinh để tiêu diệt *A. tumefaciens*, loại và nồng độ kháng sinh chọn lọc/cơ chất biểu hiện gen chỉ thị, nồng độ acetosyringone,... Hai bộ tối ưu hóa này làm cho quy trình chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* thêm phức tạp, đặc biệt là tương tác của các yếu tố này với kiểu gen thực vật.

1.8 Sàng lọc và đánh giá cây chuyển gen

Phân tích và xác nhận tích hợp gen chuyển phải được thực hiện qua trung gian một phương pháp thích hợp dựa trên các cấu trúc chuyển gen. Thực tế, các hệ thống chuyển gen có tỷ lệ tế bào, mô hoặc cây tiếp nhận gen chuyển bền vững rất thấp. Cho nên, sau khi sử dụng phương pháp chuyển gen để đưa gen chuyển vào tế bào, mô hoặc cây, có 2 vấn đề đặt ra là: (i) làm thế nào chọn lọc và tách được tế bào, mô hoặc cây chuyển gen ra khỏi số đông các tế bào, mô hoặc cây không chuyển gen; (ii) làm thế nào chứng minh sự có mặt của gen chuyển trong tế bào, mô hoặc cây và đánh giá mức độ biểu hiện của gen trong cây chuyển gen. Nhiều phương pháp phân tích phân tử (molecular analysis) và phân tích sinh học (bio-test) cho phép giải quyết những vấn đề nêu trên, từ đó đánh giá kết quả chuyển gen vào cây trồng nhanh chóng và chính xác.

1.8.1 Sàng lọc tế bào, mô hoặc cây chuyển gen nhờ gen chỉ thị chọn lọc

1.8.1.1 Gen chỉ thị chọn lọc

Để xác định các tế bào hoặc thực vật biến đổi, điều cần thiết là phát hiện DNA ngoại lai đã được tích hợp vào nhiễm sắc thể thực vật hay chưa. Các gen kháng sinh hoặc kháng một số chất khác đã được đưa vào vùng T-DNA của các vector và được sử dụng để chọn lọc cây chuyển gen. Gen *neomycin phosphotransferase* (*npt*II) tạo tính kháng kanamycin và *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) tạo ra tính kháng với hygromycin là hệ thống gen đánh dấu được lựa chọn sử dụng rộng rãi nhất trong thực vật. Một số hệ thống chọn lọc thông thường khác sử dụng: kháng sinh, bao gồm chloramphenicol, gentamicin, streptomycin, bleomycin, blasticidin; thuốc trừ cỏ, bao gồm phosphinothricin, gluphosinate, Glyphosate, bromoxynil; hoặc các dấu hiệu chuyển hóa, bao gồm acetolactate synthase, threonine dehydratase, phosphomannose isomerase (Hwang và ctv, 2017).

Tính hữu dụng của một chỉ thị tính kháng phụ thuộc vào đặc điểm của tác nhân chọn lọc, gen kháng và vật liệu thực vật sử dụng. Tác nhân chọn lọc phải ức chế hoàn toàn sinh trưởng của tế bào cây không chuyển gen, tuy nhiên, ảnh hưởng đến tế bào chuyển gen ở mức thấp nhất. Cho nên, nồng độ thấp nhất của tác nhân chọn lọc, ức chế sinh trưởng của tế bào cây không chuyển gen được sử dụng để sàng lọc tế bào chuyển gen. Mức độ mẫn cảm của tế bào cây với tác nhân chọn lọc phụ thuộc vào loại thực vật, mô, giai đoạn phát triển và điều kiện nuôi cấy. Vì vậy, trước khi sàng lọc, cần phải xác định mức độ mẫn cảm trong điều kiện cụ thể của quá trình chuyển gen. Ngoài ra, mức độ kháng cũng phụ thuộc vào tín hiệu điều khiển phiên mã và dịch mã gen kháng. Vì vậy, trước khi chuyển gen, việc thử nghiệm một vài cấu trúc gen cũng rất cần thiết (Ziemienowicz, 2001).

1.8.1.2 Gen chỉ thị chọn lọc thông dụng

Theo Miki và McHugh (2004) có khoảng 50 gen chỉ thị chọn lọc được phát hiện và sử dụng trong chuyển gen thực vật. Trong đó, hầu hết các nghiên cứu chuyển gen công bố (> 90%) và các cây trồng chuyển gen được chấp nhận thương mại trên thế giới (> 95%) sử dụng gen chỉ thị chọn lọc *npt*II, *hpt và bar*. Còn theo ISB (2003), có

gần 94% thử nghiệm đồng ruộng cây trồng chuyển gen ở Mỹ trong 2 năm 2001 và 2002 sử dụng gen chỉ thị chọn lọc *npt*II, *hpt, bar và epsp*. Trong đề tài nghiên cứu này, 2 gen *npt*II và *hpt* được sử dụng làm các gen chỉ thị chọn lọc để sàng lọc nhanh các tế bào, mô hoặc cây chuyển gen kháng sâu và chống chịu thuốc trừ cỏ (Miki và McHugh, 2004).

Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (*aph* (3')-*II*) hoặc *npt*II là chỉ thị chọn lọc được sử dụng đầu tiên và phổ biến nhất trong chuyển gen thực vật. Enzyme này có trọng lượng phân tử khoảng 25 kDa, mã hóa bởi gen *npt*II (hoặc *neo)*, có nguồn gốc từ gen nhảy Tn5 của vi khuẩn *E. coli* K12 và gây bất hoạt bằng phosphoril hóa một số kháng sinh chứa gốc aminoglycoside như kanamycin, neomycin, geneticin và paromomycin. Đa số, kanamycin được sử dụng như là tác nhân chọn lọc, phạm vi nồng độ kanamycin sử dụng 50 – 500 mg/L. Mặc dù tính kháng kanamycin là chỉ thị chọn lọc rất hữu ích cho nhiều loài thực vật, nhưng với một số loài thực vật khác như một số loài đậu đỗ và họ cây cỏ, thì kanamycin không có hiệu quả khi sử dụng làm chỉ thị chọn lọc (Ziemienowicz, 2001).

Tính kháng kanamycin của cây chuyển gen và con cháu chúng có thể được kiểm tra bằng thử nghiệm cảm ứng mô sẹo trên môi trường bổ sung kanamycin. Ngoài ra, một số phân tích *in vitro* có thể được sử dụng để phát hiện protein *npt*II một cách định lượng hoặc bán định lượng. Phân tích sự nảy mầm của hạt giống trên môi trường chứa kanamycin có thể được sử dụng để đánh giá sự phân ly của gen *npt*II ở thế hệ con cháu của cây chuyển. Một phương pháp chọn lọc khác nữa là sử dụng dung dịch kanamycin phun cục bộ lên cây trồng trong nhà kính, nhà lưới hoặc trên đồng ruộng để chọn lọc con cháu kháng kanamycin (Ziemienowicz, 2001).

Hygromycin B là kháng sinh chứa gốc aminocyclitol, có tác dụng ức chế tổng hợp protein. Gen tổng hợp *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli*. Đoạn trình tự mã hóa *hpt* được sửa đổi để biểu hiện trong tế bào thực vật (Waldron và ctv, 1985), từ đó nó được sử dụng rộng rãi như là gen chỉ thị chọn lọc tính kháng trong chuyển gen thực vật. Các gốc axit amin gần đầu tận cùng carboxil của enzyme được loại bỏ hoặc được thay thế nhằm tăng mức độ kháng hygromycin.

Tuy nhiên, đầu C ưa nước được bảo vệ và điều này có thể cần thiết cho hoạt tính *hpt* mạnh. Hygromycin B độc hơn kanamycin và giết chết tế bào nhanh hơn. Chọn lọc các tế bào chuyển gen trong điều kiện *in vitro* áp dụng ở phạm vi nồng độ từ 20 mg/L (ở cây *A. thaliana*) đến 200 mg/L (ở cây cỏ đuôi trâu) (Wang và ctv, 1992). Tính kháng hygromycin có thể được kiểm tra bằng cảm ứng mô sẹo trên môi trường chứa hygromycin. Đánh giá phân ly gen *hpt* ở thế hệ cây chuyển gen con cháu được phân tích bằng sự nảy mầm của hạt giống trên môi trường chứa hygromycin (Angenon và ctv, 1994).

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chuyển gen thực vật sử dụng nhiều loại gen chỉ thị chọn lọc như *npt*II, *hpt, bar*..., tuy nhiên, nghiên cứu chuyển gen cây bông chỉ sử dụng 2 gen *npt*II và *hpt* (Lê Trần Bình và Lê Thị Muội, 2005; Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014; Trịnh Minh Hợp và ctv, 2013). Đánh giá tính hữu ích của 2 gen này, các nhà nghiên cứu đều có nhận định chung:

- Gen *hpt* và tác nhân chọn lọc hygromycin ức chế triệt để tế bào, mô và cây bông không chuyển gen, nên hiệu quả chọn lọc cao. Tuy nhiên, hygromycin có ảnh hưởng lớn đến tế bào, mô và cây bông chuyển gen, nên các nghiên cứu chuyển gen sử dụng gen *hpt* có tỷ lệ cây dị dạng lớn hơn so với gen *npt*II; ngoài ra, tác nhân chọn lọc hygromycin đắt tiền, có độc tính cao với con người, khó bảo quản.

- Gen *npt*II và tác nhân chọn lọc kanamycin ức chế tế bào, mô và cây bông chuyển gen không triệt để, nên hiệu quả chọn lọc không cao bằng *hpt*. Tuy nhiên, kanamycin ít ảnh hưởng đến tế bào, mô và cây chuyển gen, nên các nghiên cứu chuyển gen sử dụng gen *npt*II có tỷ lệ cây dị dạng thấp hơn so với gen *hpt*; ngoài ra, tác nhân chọn lọc kanamycin dễ mua, rẻ tiền, ít độc với con người và rất dễ sử dụng và bảo quản.

Tuy nhiên, vấn đề sử dụng gen chỉ thị chọn lọc nào thì phải căn cứ vào phương pháp chuyển gen, loại mẫu biến nạp. Các nhà nghiên cứu chuyển gen bông cho rằng, nếu sử dụng phương pháp chuyển gen vi tiêm vào bầu nhuỵ qua đường ống phấn thì nên sử dụng gen *npt*II, còn chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* nên sử dụng gen *hpt* (Trịnh Minh Hợp và ctv, 2015).

Việc nghiên cứu nồng độ thấp nhất của kanamycin và hygromycin để sàng lọc tế bào, mô và cây bông chuyển gen cũng đã được nghiên cứu, cụ thể:

Với *hpt*: Trịnh Minh Hợp (2012) kết luận, nồng độ hygromycin thích hợp để sàng lọc mô sẹo chuyển *Cry*IAc (pC1300:Ubi-*Cry*IAc) trên giống SSR60F và Coker312 là 12,5 mg/L, để nhân và chọn lọc mô sẹo chuyển gen áp dụng10 mg/L, để sàng lọc cây chuyển gen trong ống nghiệm áp dụng ≥ 20 mg/L và để sàng lọc cây chuyển gen trong nhà lưới áp dụng1.500 mg/L. Lê Trọng Tình và cộng sự (2014) cũng kết luận, nồng độ hygromycin thích hợp để cảm ứng, nhân và sàng lọc mô sẹo chuyển gen *DREB2ACA* (pBIG:*Lip9*:*DREB2ACA*) vào giống SSR60F và Coker312 là 10 mg/L, để sàng lọc cây chuyển gen trong ống nghiệm áp dụng 20 mg/L và sàng lọc cây chuyển gen trong nhà lưới áp dụng1.500 mg/L.

Với *npt*II: Khi chuyển gen $P5CS_M$ (pBI101:*RD29A*:$P5CS_M$) vào giống SSR60F và Coker312 qua trung gian *A. tumefaciens*, Lê Trọng Tình và cộng sự (2014) kết luận, nồng độ kanamycin thích hợp để cảm ứng, nhân và sàng lọc mô sẹo chuyển gen là 75 mg/L, để sàng lọc cây chuyển gen trong ống nghiệm 200 mg/L và để sàng lọc cây chuyển gen trong nhà lưới 5.000 mg/L. Khi nghiên cứu chuyển gen *Cry*IAc cho các giống LRA5166, TM1 và MCU9, $P5CS_M$ và *DREB2ACA* vào giống MCU9 bằng kỹ thuật vi tiêm vào bầu nhuỵ qua đường ống phấn, Trịnh Minh Hợp (2012) và Lê Trọng Tình và cộng sự (2014) kết luận, nồng độ kanamycin để sàng lọc cây bông chuyển gen trong nhà lưới ở trong nhà lưới từ 5.000 đến 7.500 mg/L (Lê trọng Tình và ctv, 2014; Trịnh Minh Hợp, 2012).

1.8.2 Xác định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào cây chuyển gen

Cây trồng sau khi được chuyển gen và sinh trưởng trên môi trường chọn lọc, vẫn chưa đủ cơ sở để khẳng định chuyển gen thành công vì tính kháng có thể xuất hiện do đột biến. Hơn nữa, tỷ lệ chuyển gen thường rất thấp, nằm trong độ lớn của đột biến tự nhiên. Vì vậy, cần phải phân tích bổ sung bằng PCR, Southern blot để chứng minh sự có mặt của gen chuyển trong tế bào cây chuyển gen.

1.8.2.1 Xác định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào bằng PCR

Phương pháp PCR là một trong những phương pháp nhạy nhất và dễ nhất trong số tất cả các kỹ thuật phân tử được sử dụng để xác minh gen chuyển. PCR thường được thực hiện với các primer đặc hiệu trình tự plasmid và gen quan tâm. Sự khuếch đại thành công của đoạn DNA với kích thước band DNA dự kiến cho thấy sự hiện diện của gen chuyển và đoạn DNA này được xác nhận thêm thông qua trình tự DNA (Elbaidouri và ctv, 2013).

Trong những năm gần đây, sự xuất hiện của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) cho phép tạo ra các trình tự song song lớn từ toàn bộ bộ gen trong một thời gian tương đối ngắn với chi phí thấp hơn. Các kỹ thuật dựa trên PCR trong phân tích gen chuyển thường hạn chế bởi việc tạo ra các sản phẩm không đặc hiệu và không khuếch đại quá trình chèn DNA ngoại sinh lớn trong bộ gen lặp lại nhiều lần, chèn nhiều lần, trình tự gen chuyển bị đứt gãy và cản trở việc xác định gen chuyển chính xác (Park và ctv, 2017). Sự sẵn có của các công cụ NGS và tài nguyên sinh học tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu đặc tính phân tử của bộ gen nhận và các tính trạng phức tạp. Ngoài ra, các phân tích dữ liệu NGS cho phép xác định các vị trí chính xác của gen chuyển, đặc biệt là trong bộ gen có trình tự lặp lại cao và các yếu tố biến thiên mà không thể thực hiện được bằng phương pháp PCR truyền thống (Elbaidouri và ctv, 2013). Bằng cách sử dụng công nghệ này, việc xác định các sự kiện chuyển gen từ ngô GM (gen *vip*3A trong MIR162) và bông (Bt11) đã đạt được thành công. PCR xác định vùng kết hợp với NGS nhằm vào vùng gen của yếu tố *vip*3Aa20 trong MIR162 đã được chứng minh (Liang và ctv, 2014).

1.8.2.2 Xác định sự gắn kết và số bản sao gen chuyển bằng Southern blot

Phương pháp Southern blot (Southern, 1975) đơn giản, hiệu quả và rất chính xác đã được mô tả tại Đại học Edingburgh năm 1975. Sử dụng kỹ thuật này để xác định số lượng gen đã chuyển vào bộ gen nhận cũng như để phát hiện tính toàn vẹn của gen chuyển và việc sắp xếp lại gen chuyển (Elbaidouri và ctv, 2013). Nó được thực hiện bằng cách cắt DNA thành các đoạn bằng các endonuclease giới hạn, phân tách theo kích thước thông qua điện di và sau đó được chuyển lên màng nitrocellulose

hoặc nylon. Các màng có DNA liên kết sẽ được ủ trong một dung dịch bao gồm các mẫu dò đã đánh dấu và sản phẩm lai được phát hiện thông qua cơ chế phát quang của chất đánh dấu. Số lượng bản sao gen chuyển tỷ lệ thuận với số lượng các band được quan sát. Mặc dù đã được cải tiến nhiều, nhưng phương pháp đang được sử dụng hiện nay ở nhiều phòng thí nghiệm sai khác không đáng kể so với phương pháp ban đầu.

Phương pháp Southern blot được thiết kế để xác định sự hiện diện, kích thước, số lượng bản sao gen, tính đồng dạng của DNA trong một phức hợp. Chẳng hạn như phương pháp Southern blot có thể được sử dụng để phát hiện một gen đặc biệt ở trong một genome nguyên vẹn (Wang và ctv, 1992).

Trong chuyển gen, để chứng minh gen được chuyển và gắn kết vào genome cây chuyển gen, người ta sử dụng phương pháp Southern blot, vì phương pháp này rất nhạy, cho kết quả quả rất chính xác, ít bị ảnh hưởng bởi DNA lẫn tạp, đồng thời có thể nhận được thông tin về số bản sao gen chuyển, nghĩa là số lượng gen chuyển gắn vào genome cây chuyển gen (Wang và ctv, 1992). Trong nghiên cứu này, phương pháp Southern blot được sử dụng để xác định sự có mặt và gắn kết của gen *EPSPS* và *bar* trong genome cây bông chuyển gen thế hệ T_2 sau khi các cây này được sàng lọc bằng kháng sinh hygromycin/kanamycin, được xác định sự có mặt của gen chỉ thị chọn lọc *hpt/npt*II và gen *EPSPS* và *bar* bằng phương pháp PCR.

1.8.3 Đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển trong cây chuyển gen

Thông qua PCR và Southern blot, xác định được sự có mặt của gen chuyển trong tế bào, sự gắn kết của gen vào genome và số bản sao gen trong genome cây chuyển gen. Tuy nhiên, với các thông tin này, vẫn chưa thể kết luận chuyển gen thành công và tạo ra cây chuyển gen. Bởi vì, gen chuyển vào cần phải hoạt động phiên mã tổng hợp mRNA và dịch mã tổng hợp enzyme/protein có hoạt tính sinh học của gen chuyển. Ngày nay, nhờ có sự ra đời các phương pháp như Northern blot và Western blot, cho phép xác định được các hoạt động này của gen chuyển một cách nhanh chóng và chính xác. Thông thường, các cassette gen chuyển bao gồm các yếu tố từ các loài khác với vật chủ, thông thường là một tính trạng được biểu hiện cao bởi một promoter mạnh ở vùng upstream và ổn định thông qua một terminator vùng

downstream. Biểu hiện gen chuyển diễn ra trong hai giai đoạn chính, đầu tiên liên quan đến phiên mã gen đặc hiệu thành mRNA, trong bước thứ hai, mRNA được dịch mã thành protein (Fraiture và ctv, 2017).

Do sự gia tăng liên tục trong sản xuất về cây trồng biến đổi gen phức (mang cả gen đơn và đa gen), đặc biệt đối với từng sự kiện đơn lẻ, việc phát hiện các sự kiện biến đổi gen ngày càng tốn kém. Các sự kiện biến đổi gen chỉ có một tính trạng duy nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng một kỹ thuật PCR thông thường đơn giản, trong khi phát hiện và định lượng các sự kiện biến đổi gen có nhiều tính trạng hoặc xếp chồng đòi hỏi phải áp dụng kết hợp các công nghệ hiệu năng cao (Salisu và ctv, 2017).

1.8.4 Đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ của cây bông chuyển gen *bar* và *EPSPS*

Các phương pháp phân tích phân tử (molecular analysis) và phân tích sinh học (bio-test) được sử dụng để đánh giá cây bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ. Ở mức phân tử, một kết quả xác định sự có mặt và gắn kết gen dương tính chỉ là điều kiện cần, còn tính chống chịu thuốc trừ cỏ trên điều kiện đồng ruộng mới là điều kiện đủ. Tính chống chịu thuốc trừ cỏ có thể không tương quan với số bản sao gen chuyển nhưng lại có quan hệ với vị trí gắn và mức độ biểu hiện của gen chuyển (Elbaidouri và ctv, 2013). Do đó, phân tích sinh học bổ sung cần phải được thực hiện để chọn lọc được dòng bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ cao, không bị phân ly qua các thế hệ.

Bông MON 1445 (Bông RR) chống chịu Glyphosate được phát triển bởi Monsanto bằng chuyển gen *cp4 EPSPS* với promoter FMV 35S trong vector. Sự kiện này được thương mại hóa từ 1997 và làm thay đổi phương thức trừ cỏ trong canh tác bông. Nông dân trồng bông RR áp dụng Glyphosate ở giai sau nảy mầm (4 lá) (Green, 2009; Main và ctv, 2007).

Bông RR Flex (Enhanced glyphosate-resistant) được phát triển và thương mại bởi Monsanto, mang 2 gen tính trạng *cp4 EPSPS* và sự kiện MON 88913 với các

promoter FMV/TSF1 và 35S/ACT 8 (Green, 2009). Bông RR Flex tương tự Bông RR, tuy nhiên, Glyphosate được phun từ lúc mới mọc 1 tuần đến thu hoạch.

Bông chống chịu Glufosinate (Bông LL) được thương mại hóa vào năm 2004 và được phát triển bởi Bayer CropScience. Gen *bar* biểu hiện bialaphos acetyltransferase được thiết kế trong vector với promoter CaMV35S (Green, 2009). Người trồng bông LL có thể áp dụng Glufosinate từ giai đoạn nảy mầm đến quả nở (Anonymous, 2013). Để hiệu quả tối ưu, phun Glufosinate nên dựa trên kích thước của cỏ mục tiêu, không phải giai đoạn sinh trưởng của cây trồng (Lemon và ctv, 2004).

1.8.5 Di truyền gen chuyển

Việc tích hợp gen chuyển vào tế bào thực vật có thể ở dạng ổn định hoặc tạm thời. Dạng ổn định đạt được khi một số gen chuyển tích hợp thành công vào bộ gen của tế bào. Những gen chuyển này sau đó trở thành một phần của bộ gen thực vật và được di truyền cho thế hệ con cháu, cho phép thế hệ tiếp theo kế thừa và biểu hiện gen chuyển. Ngược lại, dạng tạm thời biểu hiện gen chuyển thoáng qua và gen chuyển không được tích hợp vào bộ gen thực vật. Trong cây chuyển gen dạng tạm thời, số lượng bản sao của gen chuyển vẫn được chèn vào nhưng không được sao chép. Những gen chuyển này được biểu hiện trong một khoảng thời gian giới hạn và các gen sẽ bị mất sau vài ngày sau quá trình phân chia tế bào. Hiện tại, chuyển gen dạng ổn định đạt được thông qua phương pháp *Agrobacterium*. Trong phương pháp qua trung gian *A. tumefaciens*, vùng T-DNA được đưa vào bộ gen thực vật tạo gen chuyển ổn định (Gelvin, 2005).

Di truyền thông tin gen chuyển ở thực vật thường tuân theo quy luật di truyền Mendel. Định luật đầu tiên của Mendel, định luật phân ly nói rằng một cặp alen cho mỗi gen sẽ phân ly trong quá trình hình thành giao tử, dẫn đến mỗi giao tử chỉ chứa một alen của gen. Mendel cũng phát hiện ra rằng các gen của các tính trạng khác nhau phân ly độc lập với nhau trong quá trình hình thành giao tử; những gen này được truyền lại cho thế hệ con cháu theo quy luật xác suất. Ngoài ra, định luật thứ ba Mendel nói rằng xác định được thuộc tính kiểu hình tương ứng của con cái khi một alen trội so với các alen khác. Tuy nhiên, có một số trường hợp di truyền gen chuyển

không tuân thủ quy luật Mendel. Những trường hợp này bao gồm trội không hoàn toàn, đồng trội, kiểm soát gen bởi nhiều alen và đa tính trạng.

Tương tự như vậy, di truyền gen chuyển có thể hoặc không tuân theo định luật Mendel. Tuy nhiên, quy tắc di truyền gen chuyển khác nhau do vị trí tích hợp gen chuyển và số lượng bản sao của các gen chuyển được tích hợp (Tizaoui và Kchouk, 2012). Di truyền gen không tuân theo luật Mendel bao gồm các trường hợp như là xóa bỏ một đoạn chuyển, sắp xếp lại gen chuyển, im lặng gen chuyển. Các yếu tố dẫn đến di truyền phi Mendel được liệt kê như là kiểu gen cây nhận (đột biến do phương pháp chuyển gen, bất thường nhiễm sắc thể, allen không tương đồng), do sự tích hợp gen chuyển không ổn định hoặc im lặng gen chuyển, có thể do tương tác giữa gen chuyển và genome cây nhận (di truyền gen kém, trao đổi chéo, không tương hợp nên không có đồng hợp tử). Nhìn chung, kiểu di truyền gen chuyển thường được phân tích thông qua đặc tính phân tử của sự di truyền gen và phân tích sự phân ly biểu hiện kiểu hình của gen chuyển (Tizaoui và Kchouk, 2012).

Chương 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông

Nội dung 1.1 Chọn lọc vật liệu có khả năng tái sinh cao phục vụ chuyển gen

Nội dung 1.2 Tái cấu trúc các vector chuyển gen

Nội dung 1.3 Xác định các thông số trong quy trình chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào giống Coker310 thông qua *A. tumefaciens,* gồm các thí nghiệm sau:

- Nghiên cứu tác động của mật độ vi khuẩn (OD)
- Nghiên cứu tác động của thời gian lây nhiễm *A. tumefaciens*
- Nghiên cứu tác động của thời gian đồng nuôi cấy
- Nghiên cứu tác động của ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy
- Nghiên cứu tác động của nồng độ acetosyringone trong chuyển gen
- Lựa chọn loại mẫu biến nạp phù hợp tác nhân chọn lọc/vector chuyển gen

Nội dung 1.4 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào giống Coker310 và Coker310FR

Nội dung 2 Chọn lọc dòng bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ

Nội dung 3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate, đánh giá đặc điểm thực vật học và khả năng mẫm cảm với một số bệnh hại chính của cây bông chuyển gen thế hệ T_2

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông

2.2.1.1 Chọn lọc vật liệu có khả năng tái sinh cao phục vụ chuyển gen

Vật liệu: Giống bông được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu chọn lọc dòng có khả năng tái sinh cao và chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* là Coker310 (đặc điểm thực vật học chi tiết trong phụ lục 1).

Phương pháp tiến hành

Tạo nguyên liệu tái sinh: khử trùng hạt bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng $HgCl_2$

0,1% trong 7 phút, ngâm hạt 12 giờ và tách vỏ hạt. Sau đó, đặt hạt lên môi trường gieo hạt, gồm 1/2 MSB5 + 20 g/L sucrose (pH= 6,0) + 2,5 g/L gelrite và nuôi 7 ngày. Sau đó, thu lá và thân mầm của cây 7 ngày tuổi làm nguyên liệu tái sinh (Trịnh Minh Hợp và ctv, 2006).

Bảng 2.1 Tổ hợp nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và kinetin trong các môi trường CI

Môi trường	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Môi trường	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Môi trường	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)	
	2,4-D	kinetin		2,4-D	kinetin		2,4-D	kinetin
CI_1	0,05	0,1	CI_4	0,10	0,1	CI_7	0,30	0,1
CI_2	0,05	0,3	CI_5	0,10	0,3	CI_8	0,30	0,3
CI_3	0,05	0,5	CI_6	0,10	0,5	CI_9	0,30	0,5

Cảm ứng mô sẹo trên 9 môi trường CI (Trolinder và Goodin, 1988), gồm MSB5 + 30 g/L glucose (pH= 5,8) + 2,5 g/L gelrite + 9 tổ hợp nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và KIN (bảng 2.1) và nuôi 4 tuần. Theo dõi tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi = (số mô sẹo phát sinh phôi: tổng số mô sẹo nghiên cứu) x 100. Các nghiệm thức được bố trí theo phương pháp CRD, 10 mẫu/nghiệm thức và lặp lại 3 lần.

Bảng 2.2 Thành phần trong các môi trường GR

Nghiệm thức	Thành phần			Nghiệm thức	Thành phần		
	Khoáng	Gelrite (g/L)	Glucose (g/L)		Khoáng	Gelrite (g/L)	Glucose (g/L)
GR_1	MSB_5	2,5	30	GR_7	½ MSB_5	2,5	30
GR_2	MSB_5	2,5	20	GR_8	½ MSB_5	2,5	20
GR_3	MSB_5	2,5	10	GR_9	½ MSB_5	2,5	10
GR_4	MSB_5	3,0	30	GR_{10}	½ MSB_5	3,0	30
GR_5	MSB_5	3,0	20	GR_{11}	½ MSB_5	3,0	20
GR_6	MSB_5	3,0	10	GR_{12}	½ MSB_5	3,0	10

Phôi trưởng thành được nảy mầm trên môi trường GR có các thành phần trong bảng 2.2 và nuôi 3-4 tuần cấy chuyển 1 lần, thu hoạch các phôi chín sang môi trường tương tự. Các nghiệm thức được bố trí theo phương pháp CRD, 20 phôi/nghiệm thức và lặp lại 3 lần. Tỷ lệ phôi tái sinh cây hoàn chỉnh = (số cây có đủ lá, thân, rễ : số phôi nảy mầm nghiên cứu) x 100.

Thành phần môi trường, hóa chất phục vụ nuôi cấy và tái sinh cây bông trình bày trong phụ lục 5.

2.2.1.2 Tái cấu trúc các vector chuyển gen

*** Vật liệu**

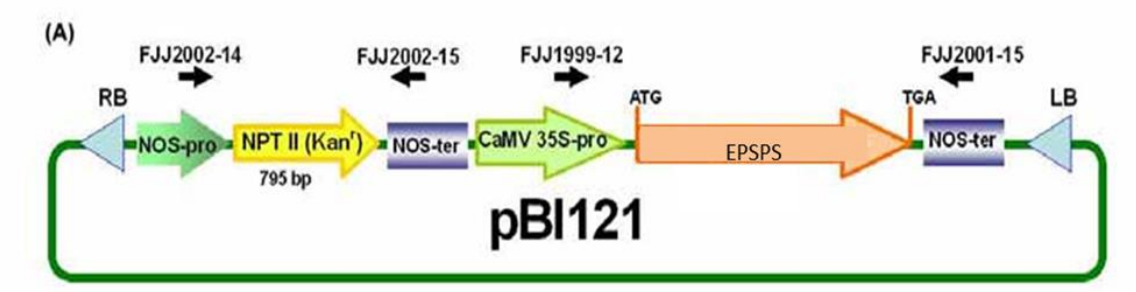
Chủng vi sinh vật: Vi khuẩn *E. coli* chủng DH5α của Hãng Invitrogen được sử dụng để nhân dòng gen; Vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260 (do Viện Sinh học Phân tử và Dược học, Trường Đại học Heidelberg, Cộng hoà Liên bang Đức cung cấp) được sử dụng cho chuyển gen vào thực vật.

*** Gen, vector và cặp primer đặc hiệu**

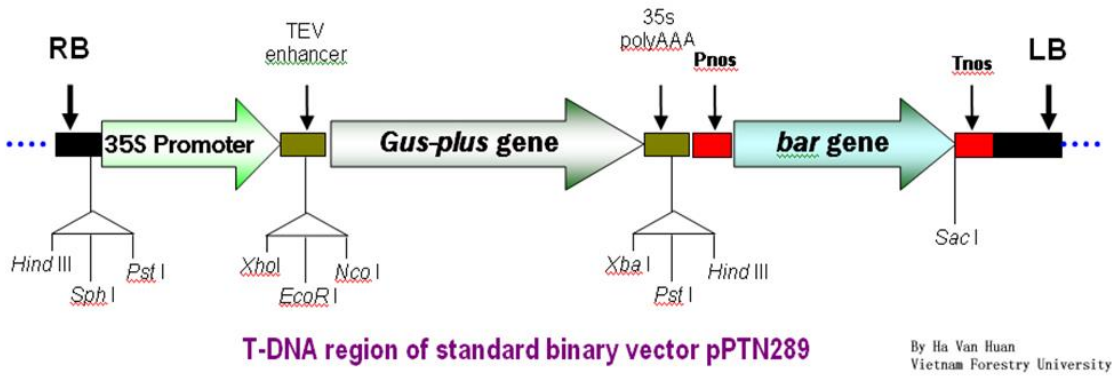
- Vector chuyển gen pBI121/*EPSPS* (sơ đồ hình 2.1) mang cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS được thiết kế bởi Nguyễn Thành Luân (2014). Trong đó, gen *EPSPS* có nguồn gốc từ gen mã hóa cho enzyme *3-phosphoshikimate-1-carboxyvinyl transferase* (biểu hiện chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate) được phân lập từ *Agrobacterium* đã được cải biến để tối ưu biểu hiện trong thực vật, đồng thời đầu 3' được gắn thêm đoạn trình tự mã hóa cho 11 axit amin trong đuôi cmyc nhằm mục đích kiểm tra sự biểu hiện của gen đích trong cây chuyển gen thông qua phương pháp lai miễn dịch (Nguyễn Thành Luân, 2014).

- Vector pPTN289 do Trường Đại học Tổng hợp Nebraska - Mỹ cung cấp, chứa cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS (sơ đồ hình 2.2) được sử dụng để chèn vào vector chuyển gen. Trong đó, gen *bar* có nguồn gốc từ *Streptomyces hygroscopicus* mã hóa cho enzyme *phosphinothricin acetyltransferase* (*PAT*) biểu hiện chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate.

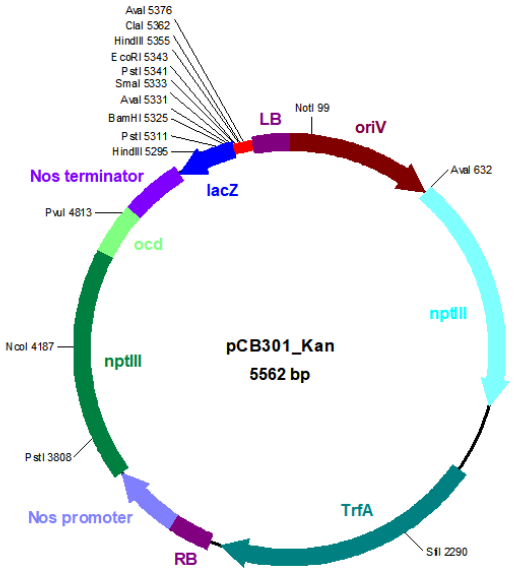
- Hai vector chuyển gen vào thực vật pCB301:*npt*II và pCAMBIA1300:*hpt* (sơ đồ vector hình 2.3 và 2.4) được sử dụng làm vector chuyển các gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông.



Hình 2.1 Cấu trúc PCaMV 35S-*EPSPS*-TNOS



Hình 2.2 Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS

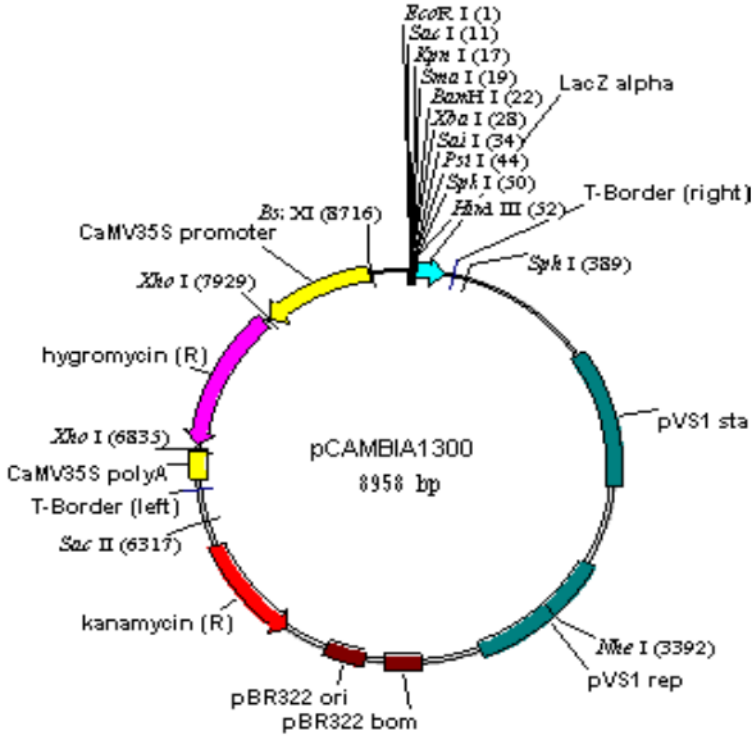


Kháng sinh chọn lọc:
Đối với *E.coli*: Kanamycin (50mg/L)
Đối với *Agrobacterium*:
Đối với thực vật:

Ghi chú

1 - 630	oriV
631 - 1636	nptII
1935 - 3083	TrfA
3130 - 3306	Right border
3307 - 3610	Nos promoter
3614 - 2497	nptII
4598 - 4809	ocd
4810 - 5065	Nosterminator
5066 - 5323	lacZ
5324 - 5416	MCS
5406 - 5562	Left border

Hình 2.3 Sơ đồ vector pCB301:*npt*II



Kháng sinh chọn lọc:

Đối với *E.coli*: Kanamycin (50mg/L)

Đối với *Agrobacterium*: Kanamycin (50mg/L)

Đối với thực vật: Hygromycin B

Ghi chú

pVS1 tái bản và ổn định trong *Agrobacterium*

Hình 2.4 Sơ đồ vector pCAMBIA1300:*hpt* (www.cambia.org)

*** Primer đặc hiệu**

Năm cặp primer đặc hiệu (bảng 2.3) PCR nhân 5 phân đoạn DNA của các gen *hpt, npt*II, *bar và EPSPS*. Các cặp primer này được tổng hợp và cung cấp bởi hãng Invitrogen chi nhánh tại Hồng Kông.

Bảng 2.3 Trình tự các cặp primer đặc hiệu và kích thước phân đoạn DNA dự kiến của các gen sàng lọc và gen đích trong cây chuyển gen

Tên primer	Trình tự	Chiều dài (bp)	Tham khảo
bar_F	5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3'	440	(Xu và ctv, 2013)
bar_R	5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'		
EPS_F	5'-GCATGCTTCACGGTGCAAGCAG-3'	1.400	(Nguyễn Thành Luân, 2014)
$CMYC_R$	5'-CGAGCTCTCAATTCAGATCCTCTTC-3'		
NPT_F	5'-TCGGCTATGACTGGGCACAACAGA-3'	795	(Kamo, 2014)
NPT_R	5'-AAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG-3'		
HPT_F	5'-TGAACTCACCGCGACGTCTGT-3'	980	(Rashid và ctv, 2014)
HPT_R	5'-TTTCCACGATCGGCGAGTACTT-3'		
VirC_F	5'-ATCATTTGTAGCGACT-3'	700	(Haas và ctv, 1995)
VirC_R	5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'		

*** Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate và Glyphosate, tạo chủng *A. tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp**

1. Thiết kế vector chuyển gen mang gen *bar*

pCB301:*bar*: Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 được cắt bằng *Hin*dIII, đầu dính tạo ra tại đầu 5' sau khi cắt sẽ được xử lý thành đầu bằng nhờ hoạt tính 3'-5' exonuclease của Klenow Fragment, cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS được cắt rời khỏi vector pPTN289 bằng *Eco*RI tạo đầu dính ở đầu 3'. Vector pCB301 được cắt mở vòng bằng cặp enzyme *Sma*I và *Eco*RI, sau đó, đoạn gen PNOS-*bar*-TNOS sẽ được gắn với vector pCB301 bằng enzyme T4 *ligase*.

pCAMBIA1300:*bar*: Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 được cắt bằng *Pst*I và *Eco*RI. Vector pCAMBIA1300 cũng cắt enzyme tại vị trí đa điểm bằng *Pst*I và *Eco*RI. Sau đó, đoạn gen PNOS-*bar*-TNOS sẽ được gắn với vector pCAMBIA1300 bằng enzyme T4 *ligase*.

2. Thiết kế vector chuyển gen mang gen *EPSPS*

pCB301:*EPSPS*: Cấu trúc gồm P35S-*EPSPS*-TNOS từ vector pBI121-*EPSPS* được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII, đầu dính tạo ra tại đầu 5' sau khi cắt sẽ được xử lý thành đầu bằng nhờ hoạt tính 3'-5' exonuclease của phân đoạn Klenow, tiếp theo cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS được cắt rời khỏi vector pBI121/*EPSPS* bằng *Eco*RI tạo đầu dính ở đầu 3'; vùng đa điểm cắt của pCB301 có chứa 1 vị trí nhận biết của *Sma*I (cắt tạo đầu bằng) nên vector này được xử lý bằng cặp enzyme *Sma*I và *Eco*RI.

pCAMBIA1300:*EPSPS*: Cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS từ vector pBI121/*EPSPS* được xử lý bằng *Hin*dIII và *Eco*RI, vector pCAMBIA1300 cũng được cắt enzyme tại vị trí đa điểm cắt bằng *Hin*dIII và *Eco*RI. Sau đó, ghép nối 2 đoạn bằng T4 *ligase*.

Các bước tiến hành

- Các phản ứng xử lý enzyme giới hạn (các bước trong phụ lục 5) được ủ ở 37 ^{o}C trong 2 giờ. Sản phẩm xử lý được tinh sạch và điện di kiểm tra trên gel agarosse 0,8%. Sản phẩm cắt giới hạn sau đó được tinh sạch bằng kit của hãng Fermentat để loại bỏ các băng DNA không đặc hiệu và các thành phần phụ của phản ứng cắt giới hạn còn lẫn trong sản phẩm.

- Phản ứng ghép nối cấu trúc vào vector chuyển gen pCB301 và pCAMBIA1300 được thực hiện bởi enzyme T4 *ligase* (các bước thực hiện trong phụ lục 5) ở 16 ^{o}C và ủ qua đêm.

- Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5α khả biến (các bước thực hiện trong phụ lục 5) và cấy trải trên môi trường chọn lọc có bổ

sung kháng sinh kanamycin (50 μg/ml) và nuôi qua đêm để thu các dòng khuẩn lạc tái tổ hợp.

- Khuẩn lạc mọc được trên môi trường có chứa kháng sinh kanamycin được kiểm tra bằng phản ứng colony - PCR (các bước thực hiện trong phụ lục 5) giữa cặp primer cho từng gen đã biến nạp (*EPSPS* và *bar*) và khuẩn lạc nào cho kết quả dương tính với phản ứng colony - PCR sẽ được chọn để tách chiết plasmid.

- Các plasmid tái tổ hợp có kết quả colony - PCR dương tính được cắt kiểm tra bằng các enzyme giới hạn đã sử dụng trong quá trình xử lý trước khi ghép nối.

- Vector chuyển gen pCB301:*EPSPS*, pCAMBIA1300:*EPSPS*, pCB301:*bar* và pCAMBIA1300:*bar* được tách chiết và tinh sạch, sau đó biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260 bằng phương pháp xung điện. Sự có mặt của gen chuyển trong vi khuẩn được kiểm tra lại bằng phản ứng colony-PCR với cặp primer khuếch đại vùng trình tự trong gen *EPSPS* (1,4 kb) và cặp primer khuếch đại vùng trình tự trong gen *bar* (0,44 kb). Ngoài ra, để xác định đúng là *A. tumefaciens*, đoạn gen mã hóa cho protein VirC (0,7 kb) bằng phản ứng colony-PCR. Quy trình colony-PCR được chi tiết trong phụ lục 5.

2.2.1.3 Xác định một số thông số chính trong quy trình chuyển gen EPSPS và bar vào cây bông qua trung gian A. tumefaciens

* **Vật liệu**: giống bông Coker310 và 4 vector chuyển gen pCB301:*EPSPS*, pCAMBIA:*EPSPS*, pCB301:*bar* và pCAMBIA:*bar* trong *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260.

Trong đó, gen chọn lọc là *hpt* kháng hygromycin ở 2 vector chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS* và pCAMBIA1300:*bar*; gen chọn lọc là *npt*II kháng kanamycin ở 2 vector chuyển gen pCB301:*EPSPS* và pCB301:*bar*.

* Thực hiện 6 thí nghiệm dưới đây, các bước thực hiện chi tiết theo quy trình trong phụ lục 6.

Thí nghiệm 1: Tác động của mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* lây nhiễm, gồm 6 mật độ vi khuẩn OD_{600} (0,025; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 và 1,25)

Thí nghiệm 2: Tác động của thời gian lây nhiễm *A. tumefaciens*, gồm 4 khoản thời gian (5 phút, 10 phút, phút và 20 phút).

Thí nghiệm 3: Tác động của thời gian đồng nuôi cấy, nghiên cứu trên 3 khoảng thời gian 40, 64 và 88 giờ sau biến nạp.

Thí nghiệm 4: Tác động của nhiệt độ đồng nuôi cấy, nghiên cứu trên 3 mức nhiệt độ là 18 ^oC, 22 ^oC và 26 ^oC.

Thí nghiệm 1-4, theo dõi các chỉ tiêu là tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%) và tỷ lệ nhiễm *A. tumefaciens* (%).

Thí nghiệm 5: Tác động của nồng độ AS cải thiện hiệu quả chuyển gen, gồm 5 nồng độ AS là 0, 25, 50, 75 và 100 mM/l. Theo dõi số cây tái sinh.

Thí nghiệm 6: Xác định loại mẫu phù hợp cho chuyển gen, nghiên cứu 4 nghiệm thức gồm 2 loại mẫu (thân và lá), 2 loại vector (pCB301 và pCAMBIA1300). Chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi (%), số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng.

Trong 1 thí nghiệm, hoàn toàn giống nhau về số lượng mẫu và các yếu tố khác như lượng dịch vi khuẩn, kích thước mẫu (mẫu thân mầm 4-5 mm; mẫu lá mầm 4x4 mm)…, ngoại trừ yếu tố thí nghiệm.

2.2.1.4 Chuyển gen bar và EPSPS vào giống Coker310 và dòng Coker310FR

Vật liệu: mẫu lá mầm và thân mầm của giống bông Coker310 và dòng Coker310FR; chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/PGV2260 mang một trong bốn vector chuyển gen pCB301:*EPSPS*, pCAMBIA1300:*EPSPS*, pCB301:*bar* và pCAMBIA1300:*bar*.

Phương pháp tiến hành: chuyển gen vào cây bông theo các bước dưới đây và sử dụng các thông số đã chọn ở các thí nghiệm thuộc mục 2.2.1.3, trong đó mẫu lá mầm

phù hợp với vector pCAMBIA1300 và mẫu thân mầm phù hợp với vector pCB301. Tiến hành 2 thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào vào mẫu lá mầm giống Coker310 và dòng Coker310FR, gồm 4 nghiệm thức sau.

1 Lá mầm Coker310-pCAMBIA1300:*EPSPS*

2 Lá mầm Coker310FR -pCAMBIA1300:*EPSPS*

3 Lá mầm Coker310 -pCAMBIA1300:*bar*

4 Lá mầm Coker310FR -pCAMBIA1300:*bar*

Thí nghiệm 2: Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào mẫu thân mầm giống Coker310 và dòng Coker310FR, gồm 4 nghiệm thức sau.

1 Thân mầm Coker310-pCB301:*EPSPS*

2 Thân mầm Coker310FR -pCB301:*EPSPS*

3 Thân mầm Coker310 -pCB301:*bar*

4 Thân mầm Coker310FR -p CB301:*bar*

Bố trí thí nghiệm: Trong một thí nghiệm, hoàn toàn giống nhau về số lượng mẫu và các yếu tố khác như lượng dịch vi khuẩn, kích thước mẫu (mẫu thân mầm 4-5 mm; mẫu lá mầm 4x4 mm)…, ngoại trừ yếu tố thí nghiệm. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi (%), số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng.

Tiến hành chuyển gen

Bước 1: Chuẩn bị mẫu

- Hạt bông được đốt lông áo bằng H_2SO_4 đậm đặc, khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng $HgCl_2$ trong 15 phút và lặp lại trong 5 phút. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng, thấm khô hạt, tách bỏ vỏ cứng và đặt lên môi trường gieo hạt G (1/2 MSB_5+ 20 g/L sucrose + 2,5 g/L gelrite, pH= 6.0).

- Nuôi tối 2-3 ngày, sau đó chuyển ra điều kiện 16/8h chiếu sáng/tối, nhiệt độ nuôi cấy $26^0C\pm2$, cường độ ánh sáng 2000 lux, nuôi trong 5-7 ngày.

- Thu hoạch cây con, lấy thân mầm cắt thành các đoạn dài 4-5 mm hoặc lá mầm cắt thành mảnh kích thước 4 x 4 mm để sử dụng làm mẫu cho thí nghiệm.

Bước 2: Chuẩn bị vi khuẩn

- Trước khi biến nạp, lấy 1 khuẩn lạc cho vào nuôi lắc trong 50 ml dịch nuôi khuẩn bổ sung kháng sinh 50 mg/L kanamycin và 50 mg/L rifamycin, nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 28 ^{o}C trong 2 ngày.

- Ly tâm dịch để thu sinh khối tế bào, rửa sạch sinh khối tế bào khỏi dung dịch nuôi khuẩn bằng dung dịch CI lỏng. Hòa tan cặn khuẩn để tạo dịch huyền phù bằng dung dịch CI lỏng, đo OD_{600} đến giá trị xác định tại thí nghiệm mật độ vi khuẩn trong mục 2.2.1.3.

Bước 3: Biến nạp và đồng nuôi cấy

- Ngâm mẫu trong dịch vi khuẩn trong thời gian xác định tại thí nghiệm thời gian lây nhiễm ở mục 2.2.1.3, sau đó thấm khô trên giấy thấm mềm và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy CI, gồm MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 0.1 mg/L 2.4-D + 0.1 mg/L kinetin, pH 5.8.

- Đồng nuôi cấy ở khoảng thời gian và nhiệt độ đã xác định tại thí nghiệm trong mục 2.2.1.3.

Bước 4: Cảm ứng mô sẹo và đánh giá mô sẹo chuyển gen

Sau khi đồng nuôi cấy 2 ngày, chuyển các mẫu biến nạp lên môi trường cảm ứng mô sẹo chuyển gen CIK: MS khoáng + B5 vitamin + 30g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 0.1 mg/L 2.4-D + 0.1 mg/L kinetine, pH5.8, bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAMBIA1300) và 500 mg/L cefotaxime ức chế *A. tumefaciens*. Cảm ứng trong 6-8 tuần.

Bước 5: Chọn lọc mô sẹo chuyển gen

- Lần 1: Những mô sẹo cảm ứng được chuyển lên môi trường chọn lọc mô sẹo chuyển gen CPK: MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, có bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin

(pCAMBIA1300) và 300mg/L cefotaxime. Thời gian nuôi 3-4 tuần.

- Lần 2: Chuyển những mô sẹo sống sót lên môi trường trường chọn lọc mô sẹo chuyển gen CPK: MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, 75 mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAMBIA1300) và 300mg/L cefotaxime. Thời gian nuôi 6-8 tuần (lượng môi trường tăng gấp đôi: 100ml/bình).

Bước 6: Cảm ứng phát sinh phôi

Những mô sẹo sống sót được chuyển lên môi trường cảm ứng phân hóa phôi (100ml/bình) EIK: MS khoáng (không có NH_4NO_3, tăng gấp đôi lượng KNO_3 (1,9 g/L)) + B5 vitamin + 30g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAM) và 200 mg/L cefotaxime. Thời gian nuôi cấy phụ thuộc vào sự phát sinh phôi của mô sẹo, 6-8 tuần cấy chuyển 1 lần.

Bước 7: Phát triển phôi chuyển gen

- Khi mô sẹo phát sinh phôi chuyển lên môi trường phát triển phôi: MS khoáng + B5 vitamin + 20 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 1g/L glutamine + 0.5 g/L asparagine, pH5.8. 2-3 tuần cấy chuyển phôi lên môi trường tương tự, cấy chuyển 13-15 lần.

- Trong quá trình cấy chuyển, tách riêng những phôi trưởng thành đặt lên môi trường nảy mầm và tái sinh cây GR5: ½ MS khoáng + ½ B5 vitamin + 20 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8.

Bước 8: Tạo cây hoàn chỉnh

Những phôi nảy mầm được tách riêng đặt lên môi trường tạo cây hoàn chỉnh GR (½ MSB_5 + 20 g/L glucose + 6g/L agar, pH=5,8). Nuôi cho đến khi cây có 4-6 lá, có bộ rễ phát triển.

Bước 9: Huấn luyện cây tái sinh

Khi cây đạt 4-6 lá thật, mang bình ra ngoài cho quen với môi trường 1-2 ngày, thu cây, rửa sạch agar và trồng vào bầu đất + cát (tỷ lệ 1:1 v/v) hoặc dung dịch ½

MSB_5 đã được khử trùng, nuôi 2 tuần trong điều kiện ẩm độ 100%. Từ tuần thứ 3 trở đi, túi nilon được mở ngắt quãng trong ngày.

Sau 4-6 tuần cây đã cứng cáp, mở túi và chuyển bầu ra khỏi phòng, khu vực để bầu cần được bao kín bằng màng polyetylen trong để giữ ẩm độ mà vẫn có đủ ánh sáng.

Bước 10: Trồng cây tái sinh ra chậu

Khi cây trong bầu cứng cáp, tiến hành trồng vào chậu hoặc trồng thẳng ra đất trong nhà lưới, chăm sóc, phòng trừ sâu bệnh hại như với cây gieo từ hạt.

Bước 12: Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen

Cây chuyển gen tạo ra ở thế hệ T_0 được sàng lọc bằng kháng sinh, PCR dương tính với gen chuyển và chọn lọc theo đặc tính thực vật học (phụ lục 1), sau đó, đặt tên theo quy ước:

Vector chuyển gen	**Giống nền**	**Tên cây T_0**
pCB301:*EPSPS*	Coker310	CE5
pCB301:*EPSPS*	Coker310FR	CFE14
pCAMBIA1300:*EPSPS*	Coker310	E8
pCAMBIA1300:*EPSPS*	Coker310FR	EF12
pCB301:*bar*	Coker310	CB3
pCB301:*bar*	Coker310FR	CFB11
pCAMBIA1300:*bar*	Coker310	B9
pCAMBIA1300:*bar*	Coker310FR	BF17

Phương pháp theo dõi

- Cây kháng hygromycin: áp dụng cho cây chuyển gen pCAMBIA1300 trong nhà lưới, thời điểm xử lý là lúc cây có 2-3 lá thật; phết dung dịch hygromycin nồng độ 1.000 mg/L lên mặt trên lá hơi xòe, 1 lá/cây, đánh dấu lá được phết bằng sơn. Theo dõi tính mẫn cảm trên lá đã phết hygromycin, chọn cây không có biểu hiện hoại tử tại vết phết dung dịch.

- Cây kháng kanamycin: áp dụng cho cây chuyển gen pCB301, thời điểm xử lý là lúc cây có 2-3 lá thật; phết dung dịch kanamycin nồng độ 4.000 mg/L lên mặt trên lá đã xòe, 1 lá/cây, đánh dấu lá được phết bằng sơn. Theo dõi tính mẫn cảm trên lá đã phết kanamycin, chọn cây không xuất hiện vết loang màu vàng.

- Cây mang gen đích: Thu lá non của các cây chọn, tách chiết DNA tổng số. Tiến hành phản ứng PCR nhân phân đoạn DNA đặc hiệu của các gen *hpt, nptII, EPSPS* và *bar*. Phản ứng PCR nhân phân đoạn DNA đặc hiệu của các gen bằng các cặp primer Bảng 2.1. Thành phần gồm 10 µl 2X GoTaq® G2 Green Master Mix (Taq DNA Polymerase, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP và 3mM $MgCl_2$); 1 µl mồi (10pM/µl); 2 µl (50 ng/µl) DNA khuôn; thêm H_2O đến thể tích 20 µl/phản ứng. Chu trình nhiệt gồm, tiền biến tính 94 ^oC: 5 phút (1 chu kỳ); biến tính 94 ^oC: 60 giây, bắt cặp 55 ^oC (*bar* và *EPSPS*), 58 ^oC (*hpt*) và 62 ^oC (*npt*II): 30 giây, kéo dài 72 ^oC: 60 giây (35 chu kỳ); kết thúc 72 ^0C: 5 phút (1 chu kỳ). Kết quả xác định trên điện di đồ, xuất hiện băng kích có thước tương đương băng trên ĐC (+): cây có PCR dương tính (+) hay gen có mặt trong tế bào; không xuất hiện băng: cây có PCR âm tính (-) hay không có gen trong tế bào.

- Cây không dị dạng: có biểu hiện hình thái thông thường và hữu thụ.

2.2.2 Chọn lọc dòng bông chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ

2.2.2.1 Chọn lọc dòng bông chuyển gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Chọn lọc dòng bông chuyển gen bằng kỹ thuật PCR (tương tự mục xác định cây dương tính với gen đích)

Chọn lọc dòng bông chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot

- DNA tổng số của cây bông được tách chiết từ lá non theo quy trình của Li và cộng sự (2001), các bước thực hiện trong phụ lục 7 (Li và ctv, 2001). Mẫu lá non (100 mg) được nghiền trong nitơ lỏng, sau đó được bổ sung 500 µl dung dịch CTAB 2% (có chứa RN*ase*) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500 µl chloroform : isoamyl (24 : 1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn

hợp sau đó được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA. Kiểm tra chất lượng DNA tổng số trên gel agarose 0,8% và xác định nồng độ trên máy quang phổ.

- Tạo mẫu dò để lai DNA/DNA theo kít "DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II" (catologue: 11 585 614 910) của Hãng Roche - Đức (các bước thực hiện trong phụ lục 9). Sản phẩm PCR nhân gen *EPSPS* (928 bp) và *bar* (440 bp) được đánh dấu để làm probe xác định sự gắn kết của gen chuyển.

- Cắt vector (tạo ra ở nội dung 1.2) bằng cặp enzyme để tạo ra phân đoạn DNA mục tiêu. Cắt 20 µg DNA tổng số của các cây chuyển gen thế hệ T_1 và giống gốc không chuyển gen (ĐC-) bằng enzyme tương ứng ở đầu LB theo danh sách dưới đây để tạo ra các phân đoạn DNA có kích thước khác nhau. Đối chứng dương là các plasmid được cắt cặp enzyme theo sơ đồ hình 3.13.

- ✓ pCB301:*EPSPS/Pst*I
- ✓ pCAMBIA1300: *EPSPS*/*Eco*RI
- ✓ pCB301:*bar*/*Eco*RI
- ✓ pCAMBIA1300:*bar*/*Eco*RI

Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 0,8% ở 20V trong thời gian qua đêm. Thấm truyền DNA lên màng lai (Amersham, Buckinghamshire, UK), lai và dò tìm theo hướng dẫn của nhà xản xuất (phụ lục 10). Kết quả xác định trên film X-Ray có xuất hiện băng lai: dòng có gen gắn kết; không xuất hiện băng lai: dòng không có gen gắn kết với genome.

Xác định hoạt động phiên mã của gen chuyển trong cây bông chuyển gen bằng kỹ thuật Northern blot

- RNA tổng số của cây chuyển gen tách chiết từ lá non theo quy trình trong phụ lục 10, sử dụng Trizol regent (catologue số 10296010) của Hãng Invitrogen. Mẫu lá non (100 mg) được nghiền nhanh trong nitơ lỏng, bổ sung ngay 750 µl trizol, sau đó li tâm 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi, bổ sung 500 µl chloroform vào dung dịch. Hỗn hợp sau được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút. Thu dịch nổi và tủa với

isopropanol và ly tâm để thu RNA tổng số. Kiểm tra chất lượng RNA tổng số trên gel agarose 1% biến tính bằng formaldehyde và xác định nồng độ trên máy quang phổ.

- 10 µg RNA được phân tách trên gel agarose 1.2% bổ sung formaldehyde 37% để phân tách thành các băng rRNA. Thấm truyền RNA đã biến tính lên màng nylon theo quy trình (phụ lục 10). Sau đó, màng nilon được bảo quản và thực hiện phép lai.

- Tạo mẫu dò để lai DNA/RNA theo kít "DIG Northern starter" (catologue 12 039 672 910) của hãng Roche (phụ lục 10). Sản phẩm PCR nhân gen *EPSPS* (1.400 bp) và *bar* (440 bp) được đánh dấu làm probe xác định sự biểu hiện của gen chuyển.

- Tiến hành phép lai với mẫu dò đã được đánh dấu để xác định hoạt động phiên mã ban đầu của gen chuyển trong genome cây bông (các bước thực hiện trong phụ lục 10). Kết quả xác định trên film X-Ray có xuất hiện băng lai: kết luận dòng có gen hoạt động phiên mã; không xuất hiện băng lai: kết luận dòng không có gen hoạt động phiên mã.

2.2.2.2 Đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ của cây bông chuyển gen

Các dòng bông chuyển gen được gieo trồng trong nhà lưới, không sử dụng các biện pháp phòng trừ cỏ khác.

Đánh giá tính chống chịu thuốc gốc Glufosinate: giai đoạn cây 3-4 lá hoặc 10-12 lá (20-30 ngày sau gieo, khi cỏ mọc rất tốt), tiến hành phun thuốc trừ cỏ Glufosinate ở nồng độ 0,6 kg ai./ha, (4 lít Basta/ha, pha 10 ml/lít nước, phun 4 lít dung dịch đã pha cho 100 m^2). Sau 4- 5 ngày theo dõi khả năng chống chịu thuốc của cây.

Đánh giá tính chống chịu thuốc gốc Glyphosate: giai đoạn cây 3-4 lá hoặc 10-12 lá (20-30 ngày sau gieo, khi cỏ mọc rất tốt), tiến hành phun thuốc trừ cỏ Glyphosate ở nồng độ 2,88 kg ai./ha, (4 lít/ha, pha 15 ml/lít nước, phun 4 lít dịch đã pha cho 100 m^2). Sau 7 - 10 ngày theo dõi khả năng chống chịu thuốc của cây.

Đánh giá mức độ tổn thương của cây bông chuyển gen và cây không chuyển gen ở giai đoạn 7 ngày sau phun, điểm đánh giá 0 - 100, trong đó 0 (không tổn thương)

và 100 (tổn thương hoàn toàn) (Frans và ctv, 1986). Tổn thương nhìn mắt thường được tính toán dựa trên quan sát triệu chứng ố vàng và hoại tử của cây bông bị xử lý thuốc với quy ước dưới đây.

Chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ cây chống chịu thuốc (%) = số cây sống/tổng số cây
- Mức độ chống chịu:

+++++: < 1% diện tích lá bị hoại tử/cong mép hoặc úa vàng (chống chịu rất cao).

++++: 1 đến 5% diện tích lá bị hoại tử/cong mép hoặc úa vàng (chống chịu cao).

+++: > 5 đến 25% diện tích lá bị hoại tử/cong mép hoặc úa vàng (chống chịu trung bình).

++: > 25 đến 50% diện tích lá bị hoại tử/cong mép hoặc úa vàng (chống chịu kém).

+: > 50% diện tích lá bị hoại tử/cong mép hoặc úa vàng (chống chịu rất kém).

2.2.3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ Basta, đặc điểm thực vật học và khả năng mẫm cảm với một số bệnh hại chính của cây bông chuyển gen thế hệ T_2

Quy luật di truyền gen chuyển

Dòng bông chuyển gen *bar* B9 và BF17 được lai tạo F1, F2 và BC1F1 qua 2 bước: Bước 1, hai dòng được lai với MCU9 (giống thuần thường dùng làm mẹ cho các giống lai đang thương mại) để tạo F1, sau đó tự thụ để tạo F2 và lai trở lại với MCU9 để tạo BC1F1. Bước 2, B9 và BF17 được lai với giống nền không chuyển gen Coker310, sau đó tự thụ tạo F1, F2 và lai tạo BC1 được tạo tương tự như trên.

Phun hoạt chất Glufosinate (0,6kg ai./ha) lên cây con ở giai đoạn 7 - 8 lá. Theo dõi cây con sống/chết ở giai đoạn 7 ngày sau phun, tỷ lệ sống sót được dùng để phân tích sự phân ly của gen chuyển.

Đặc điểm nông sinh học và hình thái

Các chỉ tiêu về hình thái thu thập theo phương pháp IPGRI và quy phạm khảo nghiệm DUS của ngành bông, so sánh với đặc điểm giống gốc (phụ lục 1).

Chọn điểm theo dõi: cố định 20 cây liên tục để theo dõi hoặc toàn bộ số cây (số lượng cây ít hơn 20 ở các dòng). Chỉ tiêu thời gian phát dục qua các giai đoạn được theo dõi trên cả 20 cây. Các chỉ tiêu còn lại gồm chiều cao cây, số cành quả, số cành đực, tổng số quả/ cây, khối lượng quả được theo dõi trên 10 cây trong số 20 cây trên (đo, đếm cách cây, trừ cây đầu hàng và cây bị mất ngọn). Tỷ lệ mọc mầm, sức nảy mầm, các đặc điểm hình thái được theo dõi trên cả hàng. Phương pháp theo dõi cho từng chỉ tiêu:

- Tỷ lệ nảy mầm (%): đếm số hạt trước khi gieo, sau tưới nước lần 1 tiến hành đếm số cây mọc (thời điểm 2 lá sò xòe hoàn toàn) vào buổi sáng:
  - Tỷ lệ nảy mầm = số cây mọc/số hạt gieo x 100%
  - Sức nảy mầm = % hạt mọc sau 6 ngày
- Thời gian sinh trưởng từ gieo đến nở hoa (ngày): tính từ ngày gieo đến ngày 50% số cây cố định có hoa đầu tiên nở.
- Thời gian sinh trưởng từ gieo đến nở quả (ngày): tính từ ngày gieo đến ngày 50% số cây cố định có quả đầu tiên nở.
- Đặc điểm hình thái theo dõi vào giai đoạn nở hoa.
- Số cành đực/cây, cành quả vị trí 1, số cành quả/cây, chiều cao cây (theo dõi tại giai đoạn nở quả).
- Số quả/cây theo dõi ở giai đoạn trước khi thu hoạch.

Đánh giá sự mẫn cảm với một số bệnh hại chính trên cây bông

- Bệnh lở cổ rễ: điều tra vào thời điểm 21 ngày sau gieo, theo dõi cả hàng.
- Bệnh đốm cháy lá: điều tra vào thời điểm 95 ngày sau gieo, theo dõi 5 cây/hàng.
- Bệnh mốc trắng: điều tra vào thời điểm 95 ngày sau gieo, theo dõi 5 cây/hàng.

Chỉ tiêu theo dõi

$$\text{Tỷ lệ bệnh/tỷ lệ hại (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây hoặc bộ phận của cây (lá) bị bệnh}}{\text{Tổng số cây hoặc bộ phận của cây (lá) điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh/chỉ số hại (\%)} = \frac{[(N1x1) + (N3x3) + (N5x5) + _(Nnxn)]}{Nxn} \times 100$$

Trong đó: $N_1 – N_5$: Số cây bị bệnh ở cấp tương ứng

Nxn: Tổng số cây điều tra

Gieo trồng và chăm sóc cây bông

- Gieo trồng cây bông chuyển gen ở trong nhà lưới.

- Lượng phân bón: 120 kg N + 60 kg P_2O_5 + 60 kg K_2O/ha.

- Các biện pháp kỹ thuật canh tác khác được thực hiện theo tiêu chuẩn ngành 10TCN 910:2006 và 10TCN 911: 2006 của bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn áp dụng cho vùng.

- Thu thập mẫu và đánh giá theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng. QCVN-01-38:2010/BNNPTNT.

2.3 Hoá chất

Trong nghiên cứu chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens*, hóa chất dùng để pha chế môi trường MS, đường glucose và sucrose có xuất xứ từ Trung Quốc; các vitamin, chất điều hòa sinh trưởng, kháng sinh chọn lọc và một số hóa chất khác có xuất xứ từ các Hãng Merck (Đức), Kanto (Nhật Bản) và Unitex Tenamyd (Canada). Hóa chất chính sử dụng trong sàng lọc, đánh giá cây bông chuyển gen có xuất xứ từ Mỹ, Đức và Ấn Độ. Trong đó, hầu hết của Hãng Merck (Đức); một số của Hãng Invitrogen, Promega, Sigma, Bio-Rad (Mỹ); Roche (Đức); và Delhi Pharm (Ấn Độ). Chi tiết tên, hãng, nước sản xuất của hóa chất chính sử dụng trong đề tài liệt kê ở phụ lục 2.

2.4 Máy móc và thiết bị

Máy móc, thiết bị chính sử dụng trong đề tài có xuất xứ từ các hãng (Astec, *Bar*nstead, Bibby, Bio-Rad, Cole Parmer, Gali, Gilson, Hettich, Hirayama, Jenway, Labconco, Luzzara-RE, Memmert, Mettler Toledo, National, Olympus, Revco, Sanyo, Satorius, SG Water, Sturart, Thermolyne, Thermosavant và UVP) của Mỹ, Anh, Đức, Pháp, Nhật Bản, Ý và Thụy Sỹ. Chi tiết tên, chủng loại, hãng, nước sản xuất của máy móc, thiết bị chính sử dụng trong đề tài liệt kê ở phụ lục 3.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả các nội dung nghiên cứu chọn lọc dòng bông có khả năng tái sinh cao, xác định các thông số trong quy trình chuyển gen, phân tích đánh giá và thử tính chống chịu thuốc trừ cỏ của cây chuyển gen được tổng hợp số liệu bằng chương trình Excel 2010. Phân tích anova và trắc nghiệm phân hạng chương trình MSTATC để xác định độ sai khác ở mức xác suất 5%. Các kết quả biểu thị bằng giá trị trung bình và đươc phân hạng bằng giá trị sai khác nhỏ nhất (Least Significant Difference-Lsd). Phân tích Chi bình phương được áp dụng dữ liệu chống chịu thuốc trừ cỏ quần thể T_1, T_2, F_2 và BC_1F_1 tạo ra từ quá trình lai các dòng B9 và BF17 với bố mẹ chúng Coker310 và MCU9.

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào cây bông

3.1.1 Chọn lọc dòng Coker310FR có khả năng tái sinh cao

Phương pháp chuyển gen dựa trên nuôi cấy mô thực vật có nhiều hạn chế, trong đó phát sinh đột biến soma, tính đặc hiệu của kiểu gen và thất bại trong quá trình thuần hóa của cây chuyển gen (Mayavan và ctv, 2013) ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen. Các nhà nghiên cứu khác nhau có điều kiện nghiên cứu và có thể sử dụng giống cây khác nhau, do đó xác định giống và phát triển quy trình tái sinh *in vitro* hiệu quả là cần thiết (Niapour và ctv, 2013). Có nhiều bước trong quá trình tái sinh cây bông, mỗi bước đều có những ảnh hưởng nhất định đến hiệu quả tái sinh. Trong đó, giai đoạn cảm ứng mô sẹo-phát sinh phôi và giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh có tính chất quyết định đến tỷ lệ cây tái sinh hoàn chỉnh.

Năm thứ nhất (R0), tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi đạt 72% trên môi trường CI4, các môi trường có nồng độ 2,4-D cao hơn (0,3mg/L: CI7-CI9) và môi trường có hàm lượng kinetin cao (CI5 và CI6) đều cho tỷ lệ phát sinh phôi mức thấp hơn (bảng 3.1). Sử dụng cây tái sinh thế hệ trước làm vật liệu tái sinh (R1-R3) đều làm tăng tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi soma, đặc biệt là R3 có 95,6% các mẫu phát sinh phôi soma (bảng 3.1).

Cảm ứng mô sẹo chất lượng tốt là bước đầu tiên ảnh hưởng và mang tính quyết định đến việc phát sinh phôi soma cũng như tái sinh cây. Hai chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D và kinetin được sử dụng đã phổ biến trong các nghiên cứu nuôi cấy tế bào ở cây bông (Chaudhary và ctv, 2003; Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014; Trịnh Minh Hợp và ctv, 2006; Trolinder và Goodin, 1988). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác có sử dụng IAA và BA cho tái sinh cây bông từ mô sẹo (Wu và ctv, 2004; Zhang và ctv, 2001), tuy nhiên, IAA được cho là ức chế cảm ứng gen *vir* (Tizaoui và Kchouk, 2012).

Vì vậy, tổ hợp 2,4-D và kinetin được sử dụng trong nghiên cứu này để cảm ứng mô sẹo và phát sinh phôi cho các thế hệ cây tái sinh. Kết quả đạt được tương tự với các nghiên cứu trên là môi trường có tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi tốt nhất là CI4 (bổ sung 0,1 mg/L 2,4D và 0,1 mg/L kinetin).

Bảng 3.1 Ảnh hưởng của môi trường cảm ứng mô sẹo đến tỷ lệ mẫu phát sinh phôi của giống Coker310 qua các thế hệ tái sinh

Nghiệm thức	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi			
	2,4-D	kinetin	R0	R1	R2	R3
CI_1	0,05	0,1	0^{c}	-	-	
CI_2	0,05	0,3	0^{c}	-	-	
CI_3	0,05	0,5	0^{c}	-	-	
CI_4	0,10	0,1	$72,2^{a}$	$86,7^{a}$	$93,3^{a}$	95,6
CI_5	0,10	0,3	$56,7^{ab}$	$73,3^{b}$	$75,6^{b}$	
CI_6	0,10	0,5	$62,2^{ab}$	$73,3^{b}$	$71,1^{bc}$	
CI_7	0,30	0,1	$54,4^{b}$	$62,2^{bc}$	$64,4^{c}$	
CI_8	0,30	0,3	$55,6^{ab}$	$66,7^{bc}$	$68,9^{bc}$	
CI_9	0,30	0,5	$44,4^{b}$	$53,3^{c}$	$57,8^{c}$	
CV%			***14,1***	***17,3***	***11,0***	
$Lsd_{0,05}$			***10,8***	***15,5***	***9,1***	

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Trong số các môi trường nảy mầm phôi (bảng 3.2), môi trường GR_5 tốt hơn so với các môi trường khác, các chỉ tiêu về tỷ lệ cây tái sinh hoàn chỉnh (R0: 36,7%; R1: 36,7% R2: 46,7% và R3: 46,7%) đạt cao nhất. Kết quả thu được cũng cho thấy, ngoài việc nâng cao tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi soma (bảng 3.1) thì tỷ lệ cây tái sinh hoàn chỉnh cũng có chiều hướng tăng dần (bảng 3.2). Mặc dù nghiệm thức GR2 cũng cho tỷ lệ cây tái sinh ở thế hệ R0 và R1 tương đương tỷ lệ này ở nghiệm thức GR5, tuy nhiên, hai thế hệ tiếp theo R2 và R3 thì tỷ lệ này không cải thiện so với R0, R1. Vật liệu thu

được sau 3 thế hệ (R3) của nghiệm thức GR5 được đặt tên Coker310FR và dùng cho các thí nghiệm chuyển gen vào giống bông Coker310.

Bảng 3.2 Ảnh hưởng của môi trường đến tỷ lệ cây tái sinh hoàn chỉnh của giống Coker310 qua các thế hệ

Nghiệm thức	Thành phần			Tỷ lệ (%) cây tái sinh hoàn chỉnh			
	Môi trường	Gelrite (g/L)	Glucose (g/L)	R0	R1	R2	R3
GR_1	MSB_5	2,5	30	$13,3^{bc}$	-	-	-
GR_2	MSB_5	2,5	20	$33,3^{a}$	$33,3^{ab}$	30,0	33,3
GR_3	MSB_5	2,5	10	$23,3^{ab}$	$30,0^{abc}$	30,0	33,3
GR_4	MSB_5	3	30	$23,3^{ab}$	$26,7^{bc}$	-	-
GR_5	MSB_5	3	20	$36,7^{a}$	$36,7^{a}$	46,7	46,7
GR_6	MSB_5	3	10	$26,7^{ab}$	$33,0^{ab}$	36,7	36,7
GR_7	½ MSB_5	2,5	30	$23,3^{ab}$	-	-	-
GR_8	½ MSB_5	2,5	20	$26,7^{ab}$	$26,7^{bc}$	-	-
GR_9	½ MSB_5	2,5	10	$26,7^{ab}$	$16,7^{c}$	-	-
GR_{10}	½ MSB_5	3	30	$10,0^{c}$	-	-	-
GR_{11}	½ MSB_5	3	20	$30,0^{ab}$	$26,7^{bc}$	-	-
GR_{12}	½ MSB_5	3	10	$13,3^{bc}$	-	-	-
CV%				***25,7***	***16,8***	-	-
$Lsd_{0,05}$				***15,6***	***11,6***	-	-

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Cải tiến quy trình tái sinh cây bông thông qua phôi soma để giảm thời gian tái sinh và hiệu quả hơn cho quá trình chuyển gen. Những khó khăn vẫn tồn tại như biến dị soma, khó tái sinh cây và hiện tượng cây tái sinh bất dục gây ra bởi thời gian nuôi cấy kéo dài. Đã có báo cáo cho thấy thành phần môi trường nảy mầm phôi ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh cây không bị dị dạng (Wu và ctv, 2004). Trong đó, gây stress thẩm thấu là một trong các phương pháp để giảm tỷ lệ cây dị dạng. Thay đổi hàm lượng khoáng MS, đường và gelrite là cách tạo stress thẩm thấu được sử dụng cho nảy mầm

phôi để giảm tỷ lệ cây tái sinh dị dạng. Kết quả đạt được ở nghiên cứu này cho thấy môi trường GR5 có đầy đủ thành phần khoáng MS, lượng đường vừa phải 20 g/L và lượng gelrite cao 3 g/L cho tỷ lệ cây dị dạng thấp nhất và cây hoàn chỉnh cao (46,7%).

3.1.2 Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate và Glufosinate, tạo chủng *A. tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp

Vector pCB301 (hình 2.3) là vector nhị phân có kích thước nhỏ nhất (5,5 kb) trong các loại đã công bố và sẵn sàng cho việc chèn các cấu trúc để chuyển vào genome thực vật. Vùng biên lặp của T-DNA trên vector pCB301 gần với vùng đa điểm cắt (MCS). Nhiều vị trí cắt giới hạn duy nhất trong vùng MCS là *Bam*HI, *Sma*I, *Pst*I, *Eco*RI, *Hin*dIII,… rất thuận lợi cho việc chèn cấu trúc gen mục tiêu. Plasmid pCB301 được chuyển trực tiếp và dễ dàng sang *Agrobacterium* bằng kỹ thuật xung điện (Cangelosi và ctv, 1991).

Vector pCAMBIA1300 (Hình 2.4) đã được sử dụng rộng rãi trong chuyển gen trên lúa (Komori và ctv, 2007) và nhiều cây trồng khác trong suốt 30 năm qua. Gen chọn lọc thực vật của pCAMBIA là phiên bản tăng cường biểu hiện gấp đôi với promoter CaMV35S và tín hiệu kết thúc CaMV35S polyA. Vector này chứa vùng trình tự cho phép chèn nguyên vẹn cấu trúc biểu hiện gen trong thực vật, bao gồm promoter và terminator (www.cambia.org). Promoter CaMV35S đã được sử dụng phổ biến, là công cụ hiệu quả trong biểu hiện protein tái tổ hợp, đặc biệt là ở các loại cây trồng khó chuyển gen (Palmer và Gleba, 2014).

Đề tài sử dụng 2 vector này cho nội dung tạo vector mang gen mục tiêu *EPSPS* và *bar* để chuyển vào cây bông. Plasmid được hoàn thành ở *E. coli* rồi chuyển sang *A. tumefaciens*.

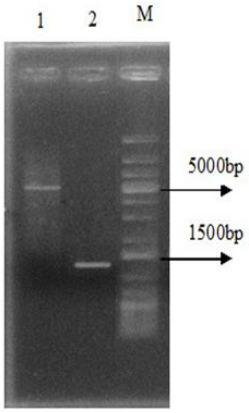
3.1.2.1 Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen bar chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate

Tái cấu trúc vector chuyển gen *bar*, có gen chọn lọc *npt*II kháng kanamycin

*** Thu nhận gen *bar* từ vector pPTN289 và gắn gen *bar* vào vector pCB301**

Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 có vị trí nhận biết của *Pst*I và *Hin*dIII ở đầu 5’ và *Eco*RI ở đầu 3’, tuy nhiên, vùng đa điểm cắt của vector

pCB301_Kan lại chứa tới 2 vị trí cắt của *Pst*I, 2 vị trí cắt của *Hin*dIII và 1 vị trí cắt của *Eco*RI nằm chính giữa. Do đó, trong trường hợp này quá trình cấu trúc lại vector chuyển gen tái tổ hợp chỉ có thể sử dụng *Eco*RI để cắt nối tại đầu 3', còn tại đầu 5' phải xử lý tạo các đầu bằng cho quá trình nối ghép các cấu trúc. Cụ thể, vector pPTN289 được cắt lần đầu bằng *Hin*dIII tạo đầu dính 5', sau đó xử lý thành đầu bằng nhờ hoạt tính 3'-5' *exonuclease* của Klenow Fragment và cuối cùng cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS được cắt rời khỏi vector pPTN289 bằng *Eco*RI tạo đầu dính ở đầu 3', đoạn cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS thu được có kích thước dự kiến 1,3 kb.

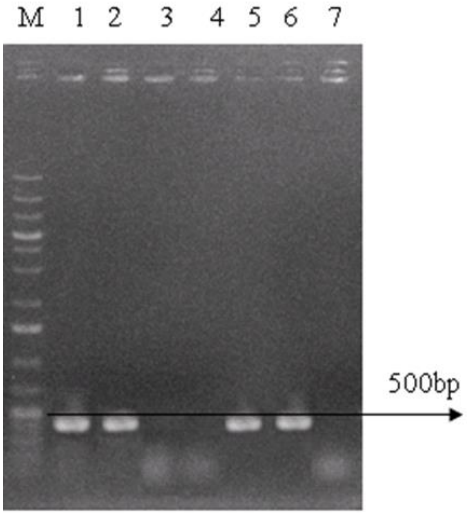


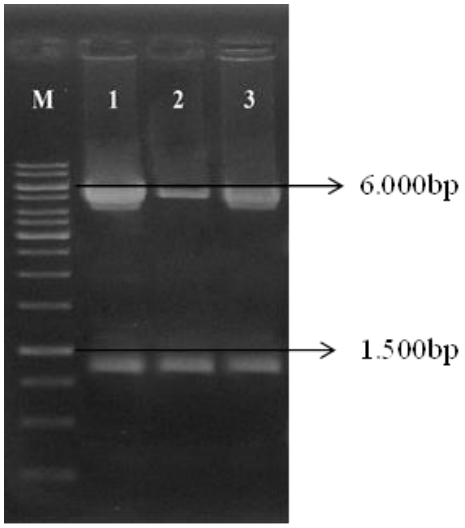
Hình 3.1 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen PNOS-*bar*-TNOS và vector pCB301 sau xử lý với enzyme giới hạn
Giếng 1: pCB301/*Sma*I+*Eco*RI;
Giếng 2: PNOS-*bar*-TNOS /*Hin*dIII+Klenow fragment+*Eco*RI;
M:Thang DNA chuẩn

Vector pCB301_Kan được cắt mở vòng (giếng 1, hình 3.1), sau đó, đoạn cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS sẽ được chèn vào vector pCB301 bằng enzyme T_4 *ligase*

*** Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng colony-PCR và phản ứng cắt**

Kết quả PCR ở hình 3.2 cho thấy, các giếng 1, 2, 5 và 6 xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước gần 500 bp phù hợp với kích thước của gen *bar* (440 bp). Plasmid có kết quả dương tính trong phản ứng PCR được kiểm tra bằng xử lý với cặp enzyme giới hạn *Pst*I và *Eco*RI (hình 3.3). Cả ba giếng 1, 2 và 3 đều xuất hiện 1 băng có kích thước gần 6.000 bp (tương đương với kích thước 5.500 bp của vector pCB301), đồng thời xuất hiện thêm băng có kích thước thấp hơn 1.500 bp phù hợp với kích thước của cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS (1.300 bp). Như vậy, plasmid đã tinh sạch là plasmid tái tổ hợp có chứa đoạn gen *bar*.





Hình 3.2 Sản phẩm PCR gen *bar* từ plasmid tái tổ hợp pCB301:*bar*

M: Thang DNA chuẩn;

Giếng 1 đến 7: plasmid pCB301:*bar*

Hình 3.3 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCB30:*bar*

M: thang DNA chuẩn;

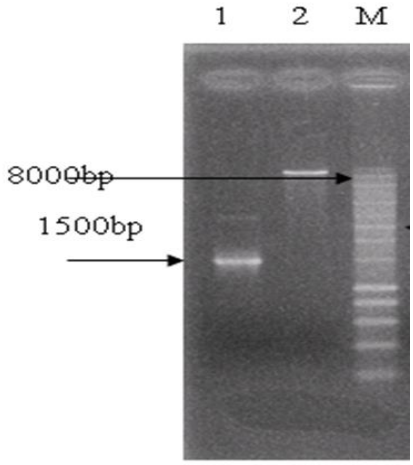
Giếng 1,2 và 3: pCB301:*bar*/*Eco*RI+*Pst*I

Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen *bar*, có gen chỉ thị chọn lọc *hpt* kháng hygromycin

*** Thu nhận gen *bar* từ vector pPTN289 và gắn vào vector pCAMBIA1300**

Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 có vị trí nhận biết của *Pst*I ở đầu 5’ và *Eco*RI ở đầu 3’. Như vậy, vector pPTN289 trước tiên được xử lý bằng *Pst*I tạo đầu dính 5’, sau đó cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS được cắt rời khỏi vector pPTN289 bằng *EcoR*I tạo đầu dính 3’, vùng cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS thu được có kích thước gần 1,3 kb (hình 3.4, giếng 1).

Song song với quá trình trên, vector pCAMBIA1300 được tiến hành xử lý enzyme tại vị trí đa điểm cắt bằng *Pst*I và *Eco*RI (kích thước gần 9 kb - hình 3.4, giếng 2) để tạo đầu dính thích hợp khi tiến hành ghép nối vector pCAMBIA1300 với PNOS-*bar*-TNOS được tách ra từ vector pPTN289.



Hình 3.4 Sản phẩm tinh sạch cassette PNOS-*bar*-TNOS và vector pCAMBIA1300 sau xử lý với enzyme giới hạn

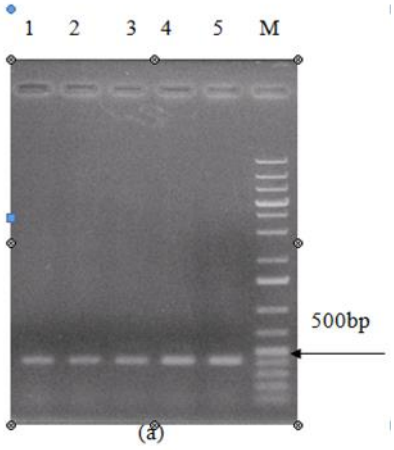
M: thang DNA chuẩn;

Giếng 1: PNOS-bar-TNOS /*Pst*I+*Eco*RI;

Giếng 2: pCAMBIA1300/*Pst*I+*Eco*RI

Trên hình 3.4, giếng số 1 là sản phẩm cắt tinh sạch của cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS có kích thước khoảng 1.300 bp; giếng số 2 là vector pCAMBIA1300 mở vòng, kích thước khoảng gần 9.000 bp. Như vậy, kết quả này cho thấy, sản phẩm xử lý bằng enzyme cắt giới hạn phù hợp với dự tính. Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS được ghép nối với pCAMBIA1300 mở vòng bằng T_4 *ligas*e, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α theo phương pháp sốc nhiệt và cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung 50 mg/ml kanamycin, nuôi qua đêm ở 37 ^oC thu khuẩn lạc.

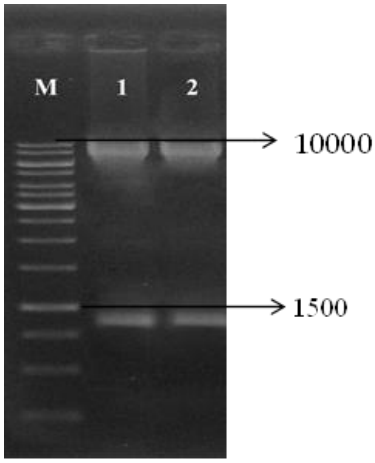
*** Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng colony-PCR và phản ứng cắt giới hạn**



Hình 3.5 Sản phẩm PCR gen *bar* từ plasmid tái tổ hợp pCAMBIA:*bar*

Giếng 1, 2, 3, 4 và 5: plasmid pCAMBIA:*bar*

M: thang DNA chuẩn



Hình 3.6 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAMBIA:*bar*

pCAMBIA:*bar*/*Eco*RI+*Pst*I

M: thang chuẩn;

Giếng 1 và 2: pCAMBIA:*bar*/*Eco*RI+*Pst*I

Để xác định chắc chắn dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp mong muốn, tiến hành PCR các plasmid tách từ các khuẩn lạc trên sử dụng cặp primer đặc hiệu *Bar*_F/ *bar*_R đối với pCAMBIA-*bar* (hình 3.5). Các plasmid đều xuất hiện một băng vạch duy nhất có kích thước phù hợp với gen *bar* (440 bp), cho thấy đã tái tổ hợp thành công vector pCAMBIA1300:*bar*

Plasmid có kết quả dương tính trong phản ứng PCR được kiểm tra bằng xử lý với cặp enzyme giới hạn *Eco*RI và *Pst*I (hình 3.6). Ở giếng 1, 2 đều xuất hiện 1 băng có kích thước gần 9.000 bp (tương đương với kích thước của vector pCAMBIA1300), ở giếng 1 và 2 xuất hiện thêm 1 băng có kích thước khoảng 1.300 bp (tương đương với kích thước của PNOS-*bar*-TNOS). Như vậy, plasmid đã tinh sạch là plasmid tái tổ hợp có chứa gen *bar*.

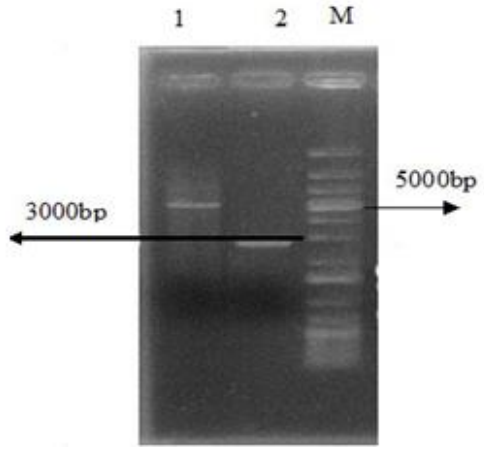
3.1.2.2 Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen EPSPS chống chịu thuốc trừ cỏ gốc glyphonate

Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen *EPSPS* và gen chỉ thị chọn lọc *npt*II kháng kanamycin

*** Thu gen *EPSPS* từ vector pBI121-*EPSPS* và cắt mở vòng vector pCB301**

Cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS trong vector pBI121/*EPSPS* có vị trí nhận biết của *Pst*I và *Hin*dIII ở đầu 5’ và *Eco*RI ở đầu 3’, tuy nhiên, vùng đa điểm cắt của vector pCB301-Kan lại chứa tới 2 vị trí cắt của *Pst*I, 2 vị trí cắt của *Hin*dIII và 1 vị trí cắt của *EcoR*I nằm chính giữa. Do đó, trong trường hợp này quá trình tái cấu trúc vector chuyển gen chỉ có thể sử dụng *Eco*RI để cắt nối tại đầu 3’, còn tại đầu 5’ phải xứ lý tạo các đầu bằng cho quá trình nối ghép gen. Cụ thể, vector pBI121:*EPSPS* trước tiên được cắt bằng *Hin*dIII, đầu dính tạo ra tại đầu 5’ sau khi cắt sẽ được xử lý thành đầu bằng nhờ hoạt tính 3’-5’*exonuclease* của Klenow Fragment và cuối cùng cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS được cắt rời khỏi vector pBI121/*EPSPS* bằng *Eco*RI tạo đầu dính ở đầu 3’(đoạn cắt có kích thước hơn 2,7 kb, hình 3.7- giếng 2). Trong khi đó, do vùng đa điểm cắt của pCB301 có chứa 1 vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *Sma*I cắt tạo đầu bằng, nên vector này chỉ cần xử lý bằng cặp enzyme *Sma*I và *Eco*RI. Sản phẩm cắt thu được có kích thước lớn hơn 5,5 kb (hình 3.7, giếng 1). Cấu

trúc P35S-*EPSPS*-TNOS và vector pCB301 mở vòng có dạng đầu bằng ở đầu 5' và đầu dính tương thích ở đầu 3' phục vụ cho quá trình nối ghép tạo vector chuyển gen tái tổ hợp.



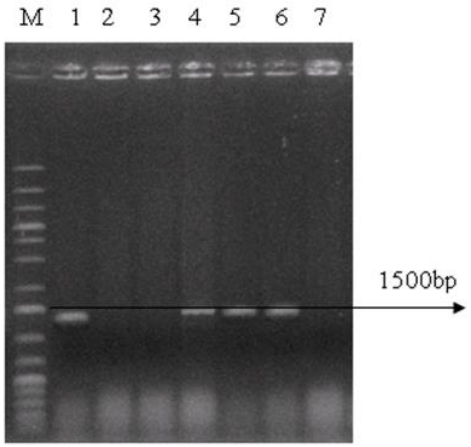
Hình 3.7 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen *EPSPS* và vector pCB301 sau xử lý với enzyme giới hạn
Giếng 1: pCB301/*Sma*I+*Eco*RI
Giếng 2: *EPSPS/Hin*dIII+*Kle*no fragment+*Eco*RI
M:Thang DNA chuẩn

*** Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCB301-*EPSPS* bằng phản ứng colony-PCR và bằng enzyme giới hạn**

Thôi gel sản phẩm cắt rồi sử dụng T_4 *ligase* để ghép nối rồi biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến chủng DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc có bổ sung kanamycin, nuôi qua đêm ở 37 ^oC để thu các khuẩn lạc chứa cấu trúc tái tổ hợp. Kiểm tra sự có mặt của gen *EPSPS* trong thể biến nạp bằng cách chọn một số khuẩn lạc và tách plasmid, PCR với các cặp primer đặc hiệu từng gen.

Ở hình 3.2 tại các giếng 1, 4, 5 và 6 xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 1.400 bp phù hợp với kích thước của gen *EPSPS*. Các khuẩn lạc dương tính được nuôi trên môi trường LB lỏng qua đêm, tách plasmid và cắt kiểm tra sự hiện diện của cấu trúc bằng cách xử lý với enzyme giới hạn *Pst*I và *Eco*RI để kiểm tra chính xác sự có mặt của P35S-*EPSPS*-TNOS hay không.

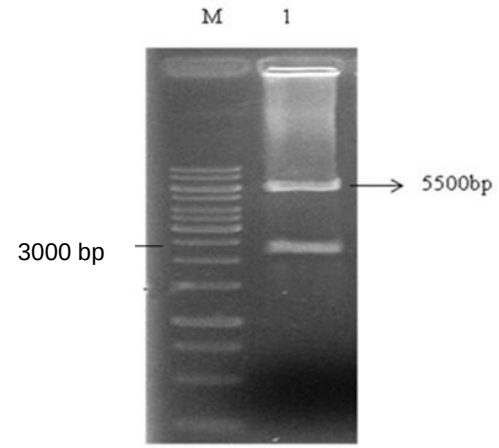
Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt enzyme (hình 3.9) xuất hiện 2 băng, băng thứ nhất có kích thước hơn 5.000 bp tương đương với kích thước của vector pCB301 (5.500bp), băng còn lại có kích thước gần 3.000 bp tương đương với kích thước đoạn cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS (2.700 bp), chứng tỏ đã tái cấu trúc thành công vector pCB301:*EPSPS* mang gen chỉ thị chọn lọc *npt*II kháng kanamycin.



Hình 3.8 Sản phẩm PCR gen *EPSPS* từ plasmid tái tổ hợp pCB301:*EPSPS*

M: Thang DNA chuẩn

Giếng 1-7: plasmid pCB301:*EPSPS*



Hình 3.9 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCB301:*EPSPS*

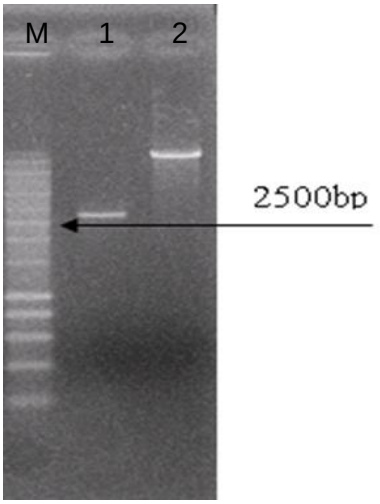
M: thang DNA chuẩn

1: plasmid pCB301:*EPSPS*/*Pst*I + *Eco*RI

Tái cấu trúc vector chuyển gen mang gen *EPSPS*, có gen chỉ thị chọn lọc *hpt* kháng hygromycin

*** Thu gen *EPSPS* từ vector pBI121-*EPSPS* và cắt mở vòng vector pCAMBIA1300**

Tương tự như thiết kế pCB301:*EPSPS*, đầu tiên vector pBI121:*EPSPS* được cắt bằng *Hin*dIII, đầu dính tạo ra tại đầu 5'. Sau đó, cấu trúc P35S-*EPSPS*-TNOS được cắt rời khỏi vector pBI121:*EPSPS* bằng *Eco*RI tạo đầu dính ở đầu 3'(có kích thước hơn 2,7 kb, hình 3.10, giếng 1).



Hình 3.10 Sản phẩm tinh sạch đoạn gen *EPSPS* và vector pCAMBIA1300 sau xử lý với enzyme giới hạn

M: thang DNA chuẩn 1 Kb

Giếng 1: pBI121/*Hin*dIII+*Eco*RI

Giếng 2: pCAMBIA1300/*Hin*dIII+*Eco*RI

Vector pCAMBIA1300 được tiến hành xử lý enzyme tại vị trí đa điểm cắt bằng cặp *Hin*dIII và *Eco*RI (thu được đoạn kích thước gần 9 kb-hình 3.10 giếng 2) để tạo

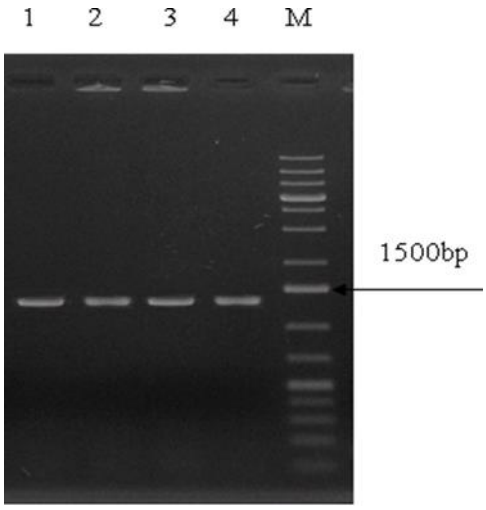
đầu dính thích hợp khi tiến hành ghép nối vector pCAMBIA1300 với đoạn gen *EPSPS* được tách ra từ pBI121-*EPSPS*.

Kết quả phân tích trên hình 3.10 cho thấy, ở giếng số 1 xuất hiện 1 băng có kích thước gần 3.000 bp phù hợp với dự tính (tương ứng với kích thước của P35S-*EPSPS*-TNOS là 2.700 bp). Ghép nối P35S-*EPSPS*-TNOS vào vector pCAMBIA1300 bằng T_4 *ligase* rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E. Coli* chủng DH5α theo phương pháp sốc nhiệt. Cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung 50 mg/ml kanamycin, nuôi qua đêm ở 37 ^oC thu khuẩn lạc.

*** Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAMBIA-*EPSPS* bằng phản ứng colony-PCR phản ứng cắt giới hạn**

Các khuẩn lạc mọc trên môi trường chứa kháng sinh chưa chắc chắn đã mang vector tái tổ hợp hoàn chỉnh mà có thể là khuẩn lạc mang các plasmid tự đóng vòng, không mang gen mong muốn, hay mang gen *EPSPS* bị đứt gãy. Để xác định chắc chắn dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp mong muốn, tiến hành PCR với plasmid tách từ khuẩn lạc, dùng cặp primer đặc hiệu với *EPSPS* (hình 3.11).

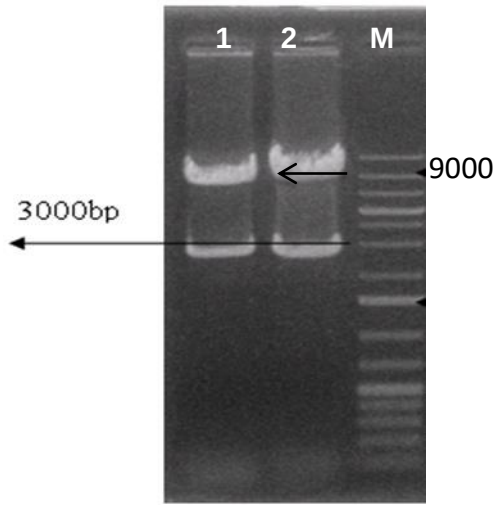
Ở hình 3.5, các giếng từ 1 đến 4 xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước gần 1.500 bp phù hợp với kích thước của gen *EPSPS* (1.400 bp). Plasmid có kết quả dương tính trong phản ứng PCR trên được kiểm tra tiếp bằng việc xử lý với cặp enzyme giới hạn *Eco*RI + *Hin*dIII (hình 3.12). Phân tích plasmid tái tổ hợp xử lý với *Eco*RI+*Hin*dIII trên giếng 1, 2 đều xuất hiện 1 băng có kích thước gần 9.000 bp (tương đương với kích thước của vector pCAMBIA1300 là 8.900 bp) và 1 băng có kích thước nhỏ hơn 3.000bp (tương đương kích thước P35S-*EPSPS*-TNOS, khoảng 2.700 bp). Như vậy, vector chuyển gen mang gen *EPSPS* có gen chỉ thị chọn lọc *hpt* kháng hygromycin đã được cấu trúc thành công.



Hình 3.11 Sản phẩm PCR gen *EPSPS* từ khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp pCAMBIA-*EPSPS*

Giếng 1, 2, 3 và 4: plasmid pCAMBIA-*EPSPS*

M: thang DNA chuẩn

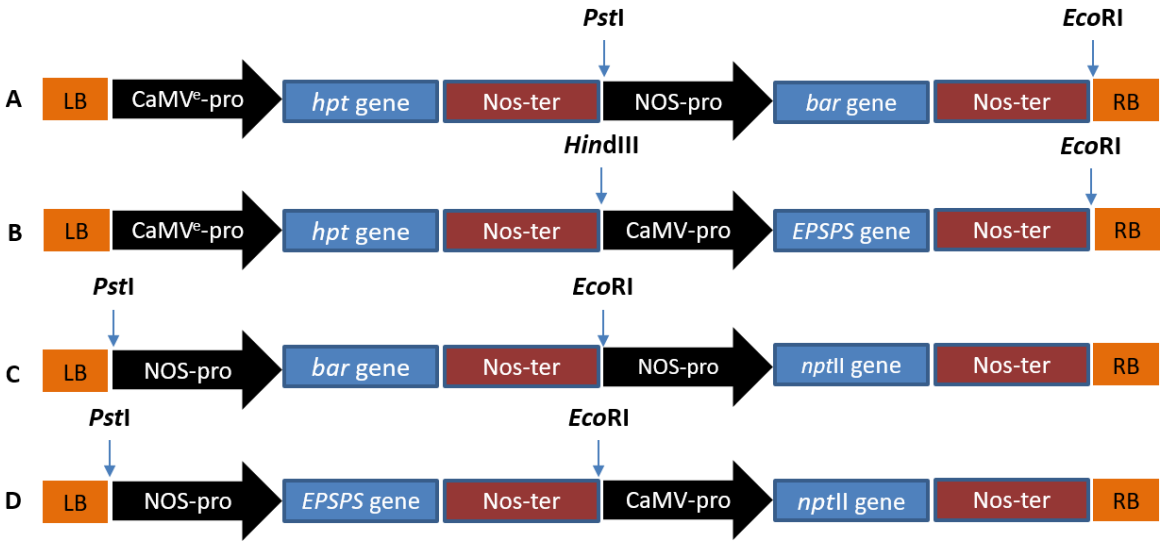


Hình 3.12 Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAMBIA-*EPSPS*

Giếng 1 và 2: pCAMBIA-*EPSPS*/*Eco*RI+*Hin*dIII

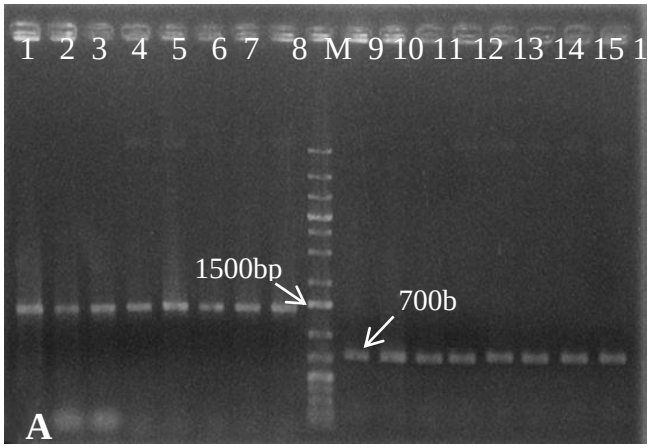
M: thang DNA chuẩn

3.1.2.3 Tạo chủng A. tumefaciens chứa plasmid tái tổ hợp

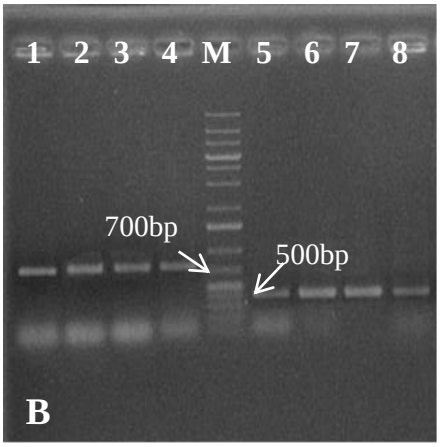


Hình 3.13 Sơ đồ vùng T-DNA của 4 vector chuyển gen.

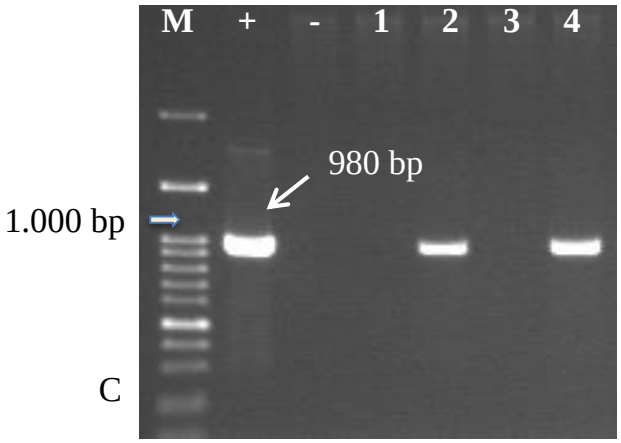
(A) pCAMBIA1300:*hpt-bar*, (B) pCAMBIA1300:*hpt-EPSPS*, (C) pCB301:*nptII-bar* và (D) pCB301:*nptII-EPSPS*



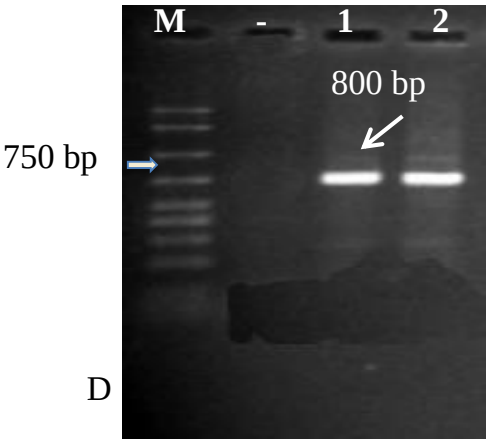
A: Sản phẩm colony - PCR *A. tumerfaciens* mang vector.
Primer *EPSPS*_F/C-MYC_R (1, 2, 3, 4: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA:*EPSPS;* 5, 6, 7, 8 Khuẩn lạc C58/pCB301: *EPSPS*);
M: Thang DNA chuẩn;
Primer *Vir*C (9, 10, 11, 12: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA1300:*EPSPS*; 13, 14, 15, 16: Khuẩn lạc C58/pCB301:*EPSPS*)



B: Sản phẩm colony - PCR *A. tumerfaciens* mang vector.
Primer *Vir*C (1, 2: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA:*bar*; 3, 4 Khuẩn lạc C58/pCB301:*bar*; M: Thang DNA chuẩn; Primer *Bar*-F và *Bar*-R (5, 6: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA1300:*bar*, 7, 8: Khuẩn lạc C58/pCB301:*bar*



C: Sản phẩm PCR nhân gen *hpt*
M: Thang DNA chuẩn 1kb
(+): pCAMBIA1300; (-) pCB301
Giếng 2: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA1300:*bar*
Giếng 4: Khuẩn lạc C58/pCAMBIA1300:*EPSPS*



D: Sản phẩm PCR nhân gen *npt*II
M: Thang DNA chuẩn 100bp
(-): pCAMBIA1300;
Giếng 1: Khuẩn lạc C58/pCB301:*bar*
Giếng 2: Khuẩn lạc C58/pCB301:*EPSPS*

Hình 3.14 Sản phẩm PCR nhân gen *vir*C, *hpt*, *npt*II, *EPSPS* và *bar*

Bước cuối cùng trong việc cấu trúc lại vector chuyển gen là tích hợp vector vào *A. tumefaciens*. Bốn vector chuyển gen pCAMBIA1300:*hpt-bar*, pCAMBIA1300:*hpt-EPSPS*, pCB301:*nptII-bar* và pCB301:*nptII-EPSPS* (hình 3.13) được tách chiết và tinh sạch, sau đó biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260 bằng phương pháp xung điện. Sự có mặt của các gen chuyển được kiểm tra lại bằng phản ứng colony - PCR với cặp primer khuếch đại gen *EPSPS* (1,4 kb), *bar* (khoảng 0,5 kb), (khoảng 0,98 kb) và *npt*II (0,8kb). Gen độc lực *vir*C mã hóa cho protein kích thích quá trình truyền T-DNA của *A. tumefaciens* chủng C58 (Lu và ctv, 2009) cũng được xác định bằng colony - PCR để khẳng định đã chuyển thành công các plasmid vào *A. tumefaciens*. Kết quả kiểm tra thể hiện trong hình 3.14 đều xuất hiện các băng có kích thước phù hợp kích thước của các gen cần kiểm tra.

3.1.3 Xác định các thông số chuyển gen *EPSPS* và *bar* vào giống Coker310 qua trung gian *A. tumefaciens*

Nhiều yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen, bao gồm nhiệt độ tăng trưởng thực vật, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi cấy vi khuẩn và thực vật, cường độ và thời gian chiếu sáng, nồng độ AS bổ sung vào, tiền xử lý bằng phytohormone, kiểu gen thực vật, chủng *A. tumefaciens* và các yếu tố khác (Niazian và ctv, 2017).

Hiệu quả chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens* có thể bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như chủng vi khuẩn, các hợp chất phenol bổ sung, cường độ lây nhiễm (gồm mật độ khuẩn, khoảng thời gian nhiễm khuẩn, khoảng thời gian đồng nuôi và nhiệt độ đồng nuôi) (Leelavathi và ctv, 2004; Sunilkumar và Rathore, 2001), loại mẫu (Firoozabady và ctv, 1987; Umbeck và ctv, 1987). Ở Việt Nam, nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố này trong quy trình chuyển gen vào giống Coker312 cũng đã được thực hiện (Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014; Trịnh Minh Hợp, 2012). Trong đề tài này, để chuyển gen hiệu quả cho giống Coker310 cũng cần các thông số phù hợp.

3.1.3.1 Tác động của mật độ vi khuẩn A. tumefaciens

Tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi rất thấp ở tất cả các công thức và biến động 0,5 - 1,3% (bảng 3.3). Tương tự với việc tác động lên tỷ lệ cảm ứng và khả năng sống sót của mô sẹo chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh chọn lọc, mật độ vi khuẩn

ảnh hưởng rõ đến tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi (bảng 3.3). Công thức mật độ khuẩn OD600 0,75 có tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi đạt cao nhất ở hầu hết các vector (0,7 - 1,3%), và cao hơn tỷ lệ phát sinh phôi cuả các công thức còn lại.

Bảng 3.3 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn (OD_{600}) đến tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi

Vector	Tỷ lệ mô sẹo (%) phát sinh phôi ở giá trị OD_{600}						
	0,25	**0,5**	**0,75**	**1,0**	**1,25**	***CV%***	***$Lsd_{0,05}$***
pCB301:*bar*	$0,2^{cd}$	$0,2^{cd}$	$1,3^{a}$	$0,7^{bc}$	0^{d}	***60,3***	***0,55***
pCB301:*EPSPS*	0^{c}	$0,3^{bc}$	$1,2^{a}$	$0,3^{bc}$	$0,2^{bc}$	***44,7***	***0,34***
pCAMBIA1300:*bar*	$0,3^{bcd}$	$0,5^{bc}$	$1,2^{a}$	$0,8^{ab}$	0^{d}	***63,3***	***0,67***
pCAMBIA1300:*EPSPS*	0^{c}	$0,2^{c}$	$0,7^{ab}$	$0,3^{bc}$	$0,3^{bc}$	***81,5***	***0,49***

Ghi chú: Trong cùng một hàng, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê

3.1.3.2 Tác động của thời gian lây nhiễm A. tumefaciens

Bảng 3.4 Ảnh hưởng của thời gian nhiễm đến tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi

Vector	Tỷ lệ mô sẹo (%) phát sinh phôi					
	5 phút	10 phút	15 phút	20 phút	***CV%***	***$Lsd_{0,05}$***
pCB301:*bar*	0,7	0,5	0,7	0,2	***51,1***	***Ns***
pCB301:*EPSPS*	$0,3^{ab}$	$0,7^{a}$	$0,2^{bc}$	0^{c}	***7,5***	***0,45***
pCAMBIA1300:*bar*	0,3	0,7	0,5	0	***77,9***	***Ns***
pCAMBIA1300:*EPSPS*	0	0,3	0,2	0	***132,7***	***Ns***

Ghi chú: Trong cùng một hàng, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ns: không sai khác

Thời gian nhiễm 10 - 15 phút có xu hướng đem lại hiệu quả chuyển gen ở tất cả các vector, trong đó, rõ ràng nhất ở pCB301:*EPSPS* nhiễm 10 phút cho tỷ lệ mô sẹo chuyển gen phát sinh phôi cao hơn các nghiệm thức khác. Các công thức nhiễm 20 phút không có mô sẹo phát sinh phôi là do mô sẹo bị tái nhiễm *A. tumefaciens* sau đó lây nhau (nếu được tách ra sớm sẽ không có hiện tượng này, nhưng do yếu tố thí nghiệm nên chúng tôi để nguyên, vì vậy ảnh hưởng đến tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi). Vì vậy, khoảng thời gian lây nhiễm vi khuẩn không nhất thiết phải chính xác tuyệt đối, nhưng

sau đó cần có biện pháp cứu những mẫu chưa nhiễm ở những đĩa có mẫu bị tái nhiễm. Sau thí nghiệm này, khoảng thời gian nhiễm 10 phút được chọn để tiến hành.

3.1.3.3 Tác động của thời gian đồng nuôi cấy

Xuất phát từ thực tế, thời gian biến nạp xong tính từ cuối buổi chiều, vì thế, sau 2, 3 và 4 đêm, tương ứng với số giờ sẽ là 40, 64 và 88 giờ. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của 3 khoảng thời gian đồng nuôi đến tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo và nhiễm *A. tumefaciens* cho từng vector được trình bày trong bảng 3.5.

Bảng 3.5 Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ tái nhiễm *A. tumefaciens*

	Vector	pCB 301:*bar*	pCB 301:*EPSPS*	pCAMBIA 1300:*bar*	pCAMBIA 1300:*EPSPS*
Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	**40 h**	90,3^{a}	89,7^{a}	38,7^{a}	34,0^{a}
	64 h	89,7^{a}	85,7^{a}	38,7^{a}	37,7^{a}
	88 h	21,0^{b}	20,0^{b}	9,7^{b}	9,3^{b}
	CV%	***7,3***	***7,2***	***21,4***	***19,1***
	Lsd$_{0,05}$	***9,76***	***9,56***	***12,4***	***10,3***
Tỷ lệ nhiễm *A. tumefaciens* (%)	**40 h**	0,7^{b}	1,2^{b}	1,0^{c}	0,8^{c}
	64 h	6,7^{b}	5,2^{b}	8,5^{b}	10,5^{b}
	88 h	40,3^{a}	38,3^{a}	37,5^{a}	44,0^{a}
	CV%	***33,3***	***20,2***	***19,6***	***14,6***
	Lsd$_{0,05}$	***10,51***	***6,01***	***6,14***	***5,36***

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Nhìn chung, ở khoảng thời gian đồng nuôi cấy 40 và 64 giờ không ảnh hưởng đến tỷ lệ cảm ứng mô sẹo của cả 2 vector pCB301 và pCAMBIA1300, nhưng đồng nuôi 88 giờ làm cho tỷ lệ mẫu cảm ứng giảm rất mạnh còn 19 - 21% ở pCB301 và còn 7,2 - 9,7% ở pCAMBIA1300 (chỉ bằng ¼ so với đồng nuôi 40 và 64 giờ, bảng 3.5). Nguyên nhân do sự phát triển quá mức của *A. tumefaciens*, đồng nuôi 40 giờ có ≤ 1,5% mẫu tái nhiễm, nuôi 64 giờ làm tăng tỷ lệ nhiễm lên 4,8 - 13,3% và nuôi 88 giờ có 37,2 - 44,0% số mẫu tái nhiễm (bảng 3.5). Mô sẹo sống sót từ những công

thức có tỷ lệ nhiễm cao cũng dễ bị tái nhiễm *A. tumefaciens* ở những giai đoạn tiếp theo (không thể hiện số liệu trong bảng 3.4). Do đó, để có được nhiều mô sẹo chuyển gen, ít tái nhiễm thì thời gian đồng nuôi cấy không nên quá 2 ngày 3 đêm (64 giờ).

Thời gian đồng nuôi cấy tối ưu là một trong những yếu tố then chốt cho chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* ở một số cây trồng, ảnh hưởng đến hiệu quả truyền T-DNA vào tế báo thực vật (Kondo và ctv, 2000). Tuy nhiên, kéo dài thời gian đồng nuôi cấy làm cho *A. tumefaciens* phát triển quá mức và làm giảm hiệu quả chuyển gen (Gelvin, 2005; Yongxue và ctv, 2010). Ở cây bông, khoảng thời gian đồng nuôi cấy tối ưu thường biến động từ 36 đến 72 giờ (Leelavathi và ctv, 2004; Sunilkumar và Rathore, 2001), khoảng 2 - 3 ngày trong các nghiên cứu ở Việt Nam (Lê Trọng Tình và ctv, 2014; Trịnh Minh Hợp và ctv, 2013). Kết quả nghiên cứu này cho thấy đồng nuôi cấy 64 giờ là tối ưu nhất cho chuyển gen.

3.1.3.4 Tác động của ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy

Mặt dù *A. tumefaciens* phát triển tốt ở 28 ^{o}C, nhưng sự tích lũy protein *Vir*B ảnh hưởng đến khả năng truyền T-DNA cũng như độc lực bị tác động mạnh ở nhiệt độ 19 - 21 ^{o}C (Baron và ctv, 2001). Đồng nuôi cấy ở nhiệt độ thấp (19-22 ^{o}C) làm tăng tỷ lệ chuyển gen ở cây đậu Mehico *(Phaseolus acutifolius)*, thuốc lá (Zambre và ctv, 2003) và cả cây bông (Sunilkumar và Rathore, 2001). Khi đồng nuôi cấy mẫu *A. thaliana* với *A. tumefaciens*, Vergunst và cộng sự (1998) thấy rằng hiệu suất chuyển gen và tần số phục hồi của cây ở 25 ^{o}C cao hơn tương đối so với 21 ^{o}C (Vergunst và ctv, 1998). Như vậy, tùy loài cây trồng, tùy giống mà sử dụng ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi phù hợp, do vậy, đề tài khảo sát tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và nhiễm *A. tumefaciens* ở 3 ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy 18, 22 và 26 ^{o}C.

Kết quả thu được ở bảng 3.6 cho thấy, đồng nuôi cấy ở ngưỡng nhiệt độ 26 ^{o}C cho tỷ lệ cảm ứng mô sẹo thấp hơn so với đồng nuôi cấy ở ngưỡng nhiệt độ 22 ^{o}C. Ngoài ra, số liệu còn cho thấy, khi đồng nuôi cấy ở ngưỡng nhiệt độ 18 ^{o}C hoặc 22 ^{o}C, sinh trưởng của *A. tumefaciens* vừa phải, nên sau này mẫu biến nạp ít bị tái nhiễm vi khuẩn. Trong khi đó, ở ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy 26 ^{o}C, cefotaxime không ức chế hoàn toàn được sinh trưởng của *A. tumefaciens*, nhiều mẫu biến nạp tái nhiễm

(35,7 - 43,0%). Đối với vector pCB301, không nhận thấy sự khác nhau về tỷ lệ mô sẹo cảm ứng, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn giữa 2 ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi 18 ºC và 22 ºC, đó là do đặc thù của mẫu thân khi biến nạp các vector có chỉ thị chọn lọc là *npt*II kháng Ka.. Đối với nhóm vector pCAMBIA1300 dễ nhận ra hơn khi thấy tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao hơn ở ngưỡng 22 ºC. Kết quả nghiên cứu chuyển gen vào giống Coker312, trong đó *Bt* (Trịnh Minh Hợp, 2012), chịu hạn *DREB2ACA* (Lê trọng Tình và ctv, 2014) đều xác định nhiệt độ đồng nuôi 21 ± 1 ºC, vì vậy, chọn ngưỡng 22 ºC để chuyển gen vào giống Coker310.

Bảng 3.6 Ảnh hưởng của ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy đến tỷ lệ cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ nhiễm *A. tumefaciens*

	Vector	pCB 301:*bar*	pCB 301:*EPSPS*	pCAMBIA 1300:*bar*	pCAMBIA 1300:*EPSPS*
Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	**18** ºC	85,3^{a}	87,7^{a}	26,3^{a}	21,7^{b}
	22 ºC	89,7^{a}	87,0^{a}	29,7^{a}	31,7^{a}
	26 ºC	15,3^{b}	13,7^{b}	4,7^{b}	6,0^{c}
	CV%	***6,4***	***5,5***	***29,8***	***14,8***
	Lsd$_{0,05}$	***8,16***	***6,89***	***12,4***	***5,84***
Tỷ lệ nhiễm *A. tumefaciens* (%)	**18** ºC	7,3^{b}	6,3^{b}	7,3^{b}	5,0
	22 ºC	7,3^{b}	6,3^{b}	6,7^{b}	5,0
	26 ºC	37,7^{a}	39,3^{a}	35,7^{a}	43,0
	CV%	***13,7***	***12,9***	***12,1***	***12,7***
	Lsd$_{0,05}$	***4,76***	***4,47***	***4,00***	***4,47***

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Trong chuyển gen thực vật, rất khó để chọn được cường độ lây nhiễm (gồm mật độ khuẩn, khoảng thời gian nhiễm khuẩn, khoảng thời gian đồng nuôi và nhiệt độ đồng nuôi) phù hợp với tác nhân chọn lọc để vừa có tỷ lệ cây tái sinh cao, vừa tránh được hiện tượng "thoát". Việc tái nhiễm mẫu với nhiễm *A. tumefaciens* làm giảm tỷ lệ tái sinh cây và gây chết mô thực vật (Hwang và ctv, 2017) và như vậy sẽ làm giảm hiệu

quả chuyển gen. Việc cần thiết là cân bằng các yếu tố này, để thu được nhiều mô sẹo có khả năng phát sinh phôi nhất.

3.1.3.5 Tác động của nồng độ acetosyringone (AS) đến hiệu quả chuyển gen

Một yếu tố quan trọng khác để có được tần số biến nạp cao là bổ sung 50 – 200 mM AS (Acetosyringone, phân tử tiết ra từ vết thương tự nhiên) trước hoặc trong giai đoạn đồng nuôi cấy để tăng cường biểu hiện gen độc lực ở vi khuẩn (Vergunst và ctv, 1998). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, AS có ảnh hưởng tích cực đến hiệu quả chuyển gen vào cây bông, tuy nhiên, nồng độ bổ sung rất khác nhau biến động 10 - 100 mM/l (Gould và ctv, 1991). Vì vậy, dải nồng độ này được đánh giá để xác định ảnh hưởng của nó đến hiệu quả chuyển gen *EPSPS* và *bar* vào cây bông.

Kết quả, chưa nhận thấy ảnh hưởng rõ ràng của AS trong nghiên cứu của này (bảng 3.7), việc thu được cây mang gen chỉ mang tính ngẫu nhiên, không phụ thuộc nồng độ. Không bổ sung cũng có cây mang gen (pCB301:*EPSPS*), bổ sung nồng độ cao nhất 100 mM/l cũng chỉ có một nghiệm thức có cây mang gen (pCAMBIA1300:*bar*).

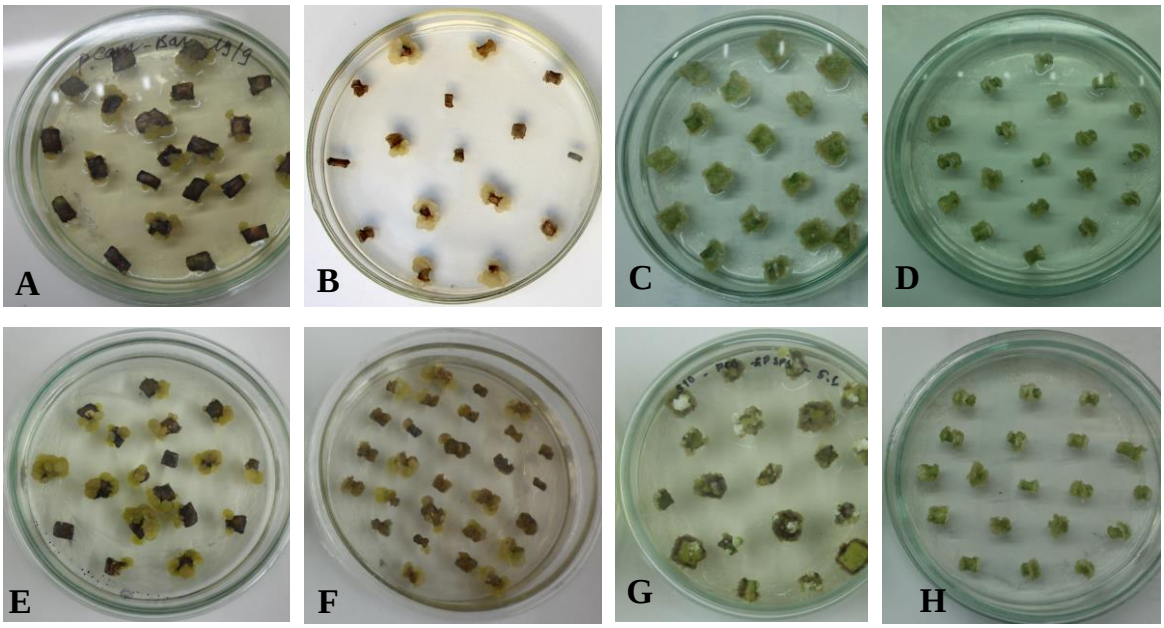
Bảng 3.7 Ảnh hưởng của nồng độ AS đến số cây mang gen

Số cây mang gen theo nồng độ AS / Vector	Nồng độ acetosyringone (AS) (mM/l)				
	0	**25**	**50**	**75**	**100**
pCB301:*bar*	0	1	0	0	0
pCB301:*EPSPS*	1	0	1	0	0
pCAMBIA1300:*bar*	0	1	2	0	1
pCAMBIA1300:*EPSPS*	0	0	0	0	0

Do đặc tính của cây bông đã chứa nhiều hợp chất phenol, bao gồm AS và đủ để hoạt hóa protein Vir của *Agrobacterium*. Như vậy, trong chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* vào giống Coker310 thì không cần sử dụng AS trong quy trình chuyển gen.

3.1.3.6 Lựa chọn loại mẫu trong chuyển gen

Một số phương pháp chuyển trung gian *A. tumefaciens* cho *A. thaliana* đã được phát triển và sử dụng nhiều kiểu gen *A. thaliana*, loại mô, chủng vi khuẩn, vector và chỉ thị chọn lọc (Niazian và ctv, 2017). Trong quá trình nghiên cứu quy trình chuyển gen vào cây bông, việc lựa chọn loại mẫu để tiến hành biến nạp có ý nghĩa quan trọng đến hiệu quả chuyển gen cũng như mức độ thành công của thí nghiệm. Các nghiên cứu chuyển gen vào cây bông đều thực hiện trên mẫu lá và thân mầm (Firoozabady và ctv, 1987; Leelavathi và ctv, 2004; Sunilkumar và Rathore, 2001; Umbeck và ctv, 1987). Nguyễn Thị Nhã và cộng sự đã xác định được mẫu lá của 4 giống Coker310, Coker312, SSR60 và SSR60F có khả năng tái sinh tốt hơn so với mẫu rễ (Nguyễn Thị Nhã và ctv, 2014). Trong thí nghiệm này, 2 loại mẫu được sử dụng để nghiên cứu là mẫu lá và thân mầm.



Hình 3.15 Lá mầm và thân mầm giống Coker310 chuyển gen cảm ứng mô sẹo

(A) Lá mầm- pCAMBIA1300:*bar*
(B) Thân mầm- pCAMBIA1300:*bar*
(C) Lá mầm- pCB301:*bar*
(D) Thân mầm- pCB301:*bar*
(E) Lá mầm-pCAMBIA1300:*EPSPS*
(F) Thân mầm- pCAMBIA1300:*EPSPS*
(G) Lá mầm- pCB301:*EPSPS*
(H) Thân mầm- pCB301:*EPSPS*

Các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đã trình bày trong các mục 3.3.1 - 3.3.3, đều sử dụng mẫu thân làm vật liệu, kết quả khác biệt giữa các ngưỡng không rõ ràng, có xu hướng phụ thuộc chỉ thị chọn lọc/vector. Vì vậy, thí nghiệm này cho thấy ảnh hưởng của mẫu, gen chọn lọc đến hiệu quả chuyển gen của 2 vector pCAMBIA1300 và pCB301, bên cạnh đó, thí nghiệm cũng áp dụng các thông số đã xây dựng mục 3.3.1 - 3.3.3 để tìm ra chỉ tiêu bị ảnh hưởng.

Bảng 3.8 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ cây (%) không dị dạng từ mẫu lá mầm Coker310 chuyển gen

Vector	Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi	Số cây tái sinh	Tỷ lệ (%) cây gen đích	Tỷ lệ (%) cây không dị dạng
pCAMBIA1300:*EPSPS*	1,2[b]	1,8	63,3	46,7
pCAMBIA1300:*bar*	1,8[a]	3,0	68,3	53,3
pCB301:*EPSPS*	0[c]	-	-	-
pCB301:*bar*	0[c]	-	-	-
CV (%)	***48,9***	**-**	**-**	**-**
Lsd $_{0,05}$	***0,5***	**-**	**-**	**-**

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Ở giai đoạn cảm ứng mô sẹo (hình 3.15), mỗi gen chọn lọc cho biểu hiện cảm ứng mô sẹo khác nhau, bằng mắt thường dễ dàng cảm nhận được ảnh hưởng của 2 gen chọn lọc *npt*II và *hpt* đến khối lượng công việc, thời gian và hóa chất dùng cho chuyển gen. Khi chuyển gen chọn lọc *hpt*, mô sẹo cảm ứng không nhiều trên cả mẫu lá và mẫu thân và dễ dàng phân biệt mức độ cảm ứng của các mẫu cũng như phân biệt được mô sẹo đẹp để chuyển sang bước chọn lọc (hình 3.15 A, B, E, F); trong khi đó, chuyển gen *npt*II thì hầu hết các mẫu đều cảm ứng mô sẹo (hình 3.15 C, D, G, H), không phân biệt được có mô sẹo đẹp hay xấu ở giai đoạn này, do đó, cần phải cấy chuyển toàn bộ số mô sẹo sang môi trường chọn lọc, phải đến giai đoạn chọn lọc lần 3 mới xác định được mô sẹo tốt.

Kết quả ghi nhận trong bảng 3.8 chỉ ra rằng, mô sẹo từ mẫu lá mầm chuyển gen pCAM:*EPSPS* và pCAM:*bar* có khả năng phát sinh phôi cao (1,2 và 1,8%), còn mô sẹo từ mẫu lá mầm chuyển gen pCB301:*EPSPS* và pCB301:*bar* không có khả năng phát sinh phôi. Như vậy, mẫu lá mầm không phù hợp để chuyển các vector có chỉ thị chọn lọc là gen *npt*II.

Bảng 3.9 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu thân mầm Coker310 chuyển gen

Vector	Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi	Số cây tái sinh	Tỷ lệ (%) cây mang gen đích	Tỷ lệ (%) cây không dị dạng
pCAMBIA1300:*EPSPS*	0,5^{b}	0,8^{b}	0^{c}	10,0^{b}
pCAMBIA1300:*bar*	0,7^{b}	1,0^{b}	60,0^{a}	30,0^{b}
pCB301:*EPSPS*	1,3^{a}	2,2^{a}	33,3^{b}	76,7^{a}
pCB301:*bar*	1,7^{a}	3,2^{a}	38,3^{b}	73,3^{a}
CV (%)	***36,9***	***44,8***	***90,4***	***60,7***
Lsd$_{0,05}$	***0,5***	***1,1***	***39,9***	***38,7***

Ghi chú: Trong cùng một cột những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Khác với chuyển vào mẫu lá mầm, khi chuyển 4 vector này vào mẫu thân mầm đều thu được mô sẹo phát sinh phôi, nhưng tỷ lệ khác nhau tùy thuộc vào vector (bảng 3.9). Trong đó, pCB301 cho tỷ lệ cao hơn 1,3% (pCB301:*EPSPS*) và 1,7% (pCB301:*bar*) so với pCAMBIA1300 là 0,5% (pCAM:*EPSPS*) và 0,7% (pCAM:*bar*). Kết quả tương tự đạt được khi tái sinh cây, chuyển gen bằng vector pCB301 cho số cây nhiều hơn (trung bình 2 - 3 cây) và ít cây bị dị dạng hơn (73,3 - 76,7% cây không dị dạng), còn khi chuyển bằng vector pCAM cho 0 - 1 cây/lần nhắc và hầu hết chúng đều dị dạng (chỉ có 10% hoặc 30% cây không dị dạng). Tuy nhiên, khi chuyển bằng vector pCB301 cho tỷ lệ cây mang gen đích khá thấp 33,3 - 38,3%. Trường hợp chuyển vector pCAM:*EPSPS* không có cây nào mang gen *EPSPS* là do số lượng mẫu

quá ít, chỉ có 2 mô sẹo của 1 lần nhắc phát sinh phôi và cây tái sinh từ 2 mô sẹo này không mang gen.

Trong các thí nghiệm chuyển gen thực vật, gen chỉ thị có thể đóng vai trò điều khiển, cung cấp các điểm tham chiếu cho hầu như tất cả các phép đo quan trọng trong các quá trình chuyển gen, như tần số chuyển gen, tăng trưởng của các tế bào, hiệu quả tái sinh của cây, sự tăng trưởng của cây chuyển gen, kiểu hình của thực vật, mức độ biểu hiện gen ngoại lai, ảnh hưởng đến gen đích… (Toshihiko và ctv, 2006). Qua 2 thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của loại mẫu cho thấy, để thu được cây chuyển gen mang gen đích có khả năng sinh trưởng bình thường thì mẫu ban đầu để biến nạp phải phù hợp với tác nhân chọn lọc. Vector pCAMBIA1300 mang gen chọn lọc *hpt* có hiệu quả hơn khi dùng mẫu lá để biến nạp và vector pCB301 mang gen chọn lọc *npt*II có hiệu quả hơn khi dùng mẫu thân để biến nạp.

3.1.4 Chuyển các gen *EPSPS* và *bar* vào giống Coker310 và dòng Coker310FR

Bảng 3.10 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu lá mầm chuyển gen

Nghiệm thức	Tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi (%)	Số cây tái sinh	Tỷ lệ (%) cây mang gen đích	Tỷ lệ (%) cây không dị dạng
Lá mầm I-pCAMBIA1300:*EPSPS*	1,4^{c}	9,6^{b}	66,4^{c}	62,6
Lá mầm II-pCAMBIA1300:*EPSPS*	2,6^{b}	14,6^{a}	73,8^{ab}	64,3
Lá mầm I-pCAMBIA1300:*bar*	1,4^{c}	10,4^{b}	67,9^{bc}	65,0
Lá mầm II-pCAMBIA1300:*bar*	2,8^{a}	15,8^{a}	76,0^{a}	64,7
CV (%)	***6,3***	***9,4***	***6,9***	***14,1***
$Lsd_{0,05}$	***0,2***	***1,6***	***6,6***	***Ns***

Ghi chú: (I)-Coker310; (II)- Coker310FR; *Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.*

Dòng bông Coker310FR (dòng có khả năng tái sinh hoàn toàn) được chọn lọc từ Coker310, sau đó, tự thụ và kiểm tra khả năng tái sinh liên tục ít nhất 3 thế hệ

(kết quả mục 3.1). Đã có kết quả nghiên cứu cho thấy các dòng FR cải thiện đáng kể hiệu quả chuyển gen vào cây bông (Chaudhary và ctv, 2003) và còn là cây mô hình cho nghiên cứu cơ chế tái sinh ở cây bông (Pandey và Bhupendra, 2014). Bên cạnh việc chuyển gen vào giống Coker310, dòng Coker310FR được sử dụng để tạo cây chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ và đánh giá việc cải thiện hiệu quả chuyển gen.

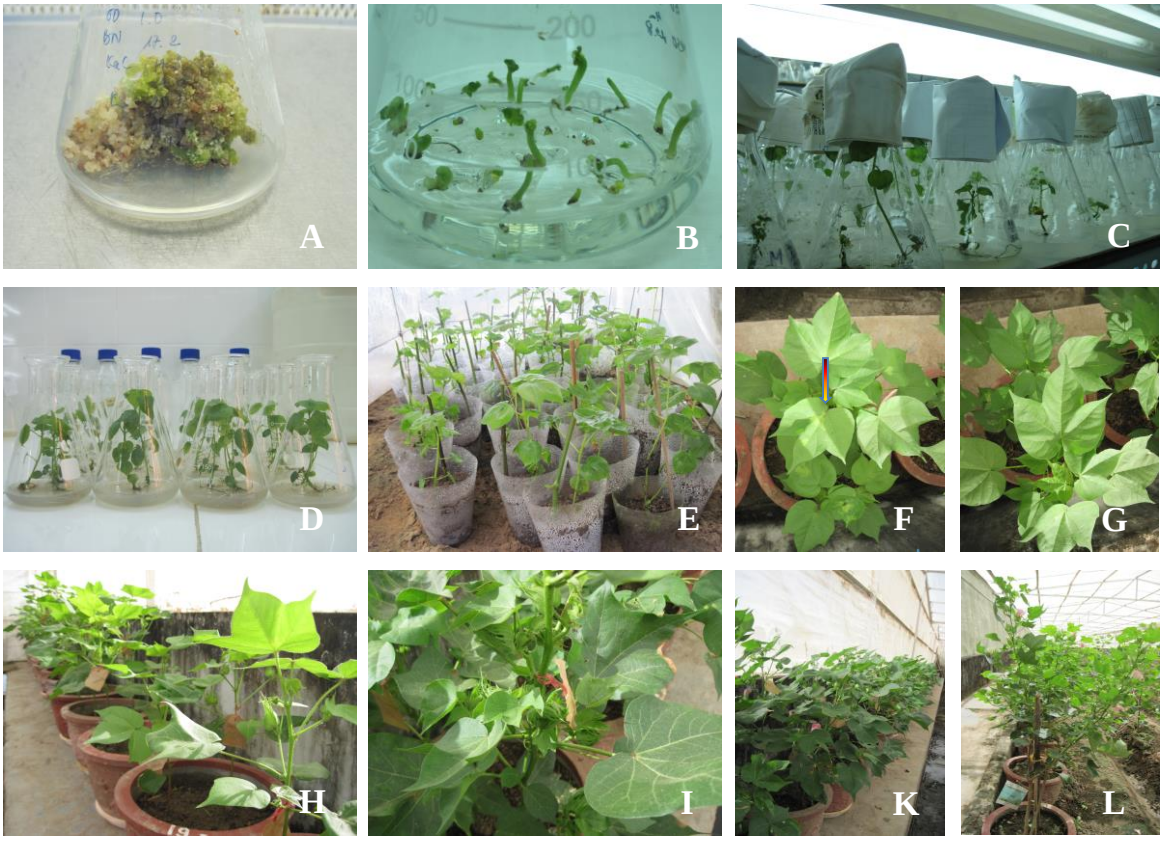
Bảng 3.11 Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh, tỷ lệ (%) cây mang gen đích và tỷ lệ (%) cây không dị dạng từ mẫu thân mầm chuyển gen

Nghiệm thức	Tỷ lệ (%) mô sẹo phát sinh phôi	Số cây tái sinh	Tỷ lệ (%) cây mang gen đích	Tỷ lệ (%) cây không dị dạng
Thân mầm I-pCB301:*EPSPS*	1,5^{c}	14,4^{c}	23,6^{b}	79,1
Thân mầm II-pCB301:*EPSPS*	1,8^{b}	18,0^{b}	26,6^{ab}	80,0
Thân mầm I-pCB301:*bar*	1,7^{bc}	15,0^{c}	25,5^{b}	78,6
Thân mầm II-pCB301:*bar*	2,1^{a}	20,6^{a}	30,2^{a}	82,5
CV (%)	***11,4***	***7,6***	***13,0***	***3,0***
Lsd$_{0,05}$	***0,3***	***1,7***	***4,6***	***Ns***

Ghi chú: (I)-Coker310; (II)- Coker310FR; *Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê.*

Kết quả chuyển gen *EPSPS* và *bar* chịu thuốc trừ cỏ trong vector pCAMBIA1300 vào mẫu lá mầm ở bảng 3.10 cho thấy, giống ảnh hưởng rất rõ đến hiệu quả chuyển gen thể hiện qua các chỉ tiêu về tỷ lệ mô sẹo chuyển gen phát sinh phôi, số cây tái sinh và số cây mang gen. Tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi từ mẫu lá mầm giống Coker310 (lá mầm I) chuyển gen đạt 1,4%, thấp hơn rõ ràng so với tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi từ mẫu lá mầm dòng Coker310FR (lá mầm II) đạt 2,6% cho gen *EPSPS* và 2,8% cho gen *bar*. Do có số lượng mô sẹo phát sinh phôi cao, nên số cây tái sinh từ lá mầm dòng Coker310FR cũng nhiều hơn (14,6 - 15,8 cây) so với số cây tái sinh từ lá mầm giống Coker310 (9,6 - 10,4 cây). Kết quả tương tự đạt được ở tỷ lệ cây mang gen, các công thức biến nạp vào mẫu lá mầm dòng Coker310FR có nhiều

cây mang gen hơn (khoảng 3/4 số cây tái sinh) so với số cây mang gen (khoảng 2/3 số cây tái sinh) ở các công thức biến nạp vào mẫu lá mầm Coker310. Có 62,6 - 65% số cây chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường và không nhận thấy có sự khác biệt về tỷ lệ cây chuyển gen không dị dạng giữa 2 giống bông này (bảng 3.10).



Hình 3.16 Quá trình tái sinh, ra cây và chọn lọc cây chuyển gen T_0.

(A) Mô sẹo chuyển gen phát sinh phôi

(B) Phôi nảy mầm tái sinh cây

(C, D) Tạo cây hoàn chỉnh và chuẩn bị ra cây

(E) Cây ở giai đoạn bầu

(F) Cây không chống chịu kháng sinh

(G) Cây chống chịu kháng sinh

(H) Treo biển đánh dấu cây kháng

(I) Cây đã kiểm tra sự có mặt của gen chuyển (có quả, ít hạt)

(K) Cây đã kiểm tra sự có mặt của gen chuyển (sinh trưởng bình thường)

(L) Cây đã kiểm tra sự có mặt của gen chuyển (không có quả)

Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của giống đến hiệu quả chuyển gen *EPSPS* và *bar* chống chịu thuốc trừ cỏ trong vector pCB301 (bảng 3.11) thấy rằng, cùng vector chuyển gen thì công thức dùng mẫu thân mầm của dòng Coker310FR (thân mầm II) cho tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi, số cây tái sinh và số cây mang gen cao hơn những giá trị này ở công thức chuyển vào mẫu thân mầm giống Coker310 (thân mầm I). Ở mẫu thân dòng Coker310FR, tỷ lệ phát sinh phôi cao hơn đạt 1,8 - 2,1%, tái sinh được 18 - 20,6 cây và có 26,6 - 30,2% số cây dương tính với gen chuyển; Ở mẫu thân Coker310, tỷ lệ phát sinh phôi thấp hơn đạt 1,5 - 1,7%, tái sinh được 14,4 - 15 cây và có 23,6 - 25,5% số cây dương tính với gen chuyển. Không nhận thấy có sự sai khác về tỷ lệ cây chuyển gen không dị dạng giữa các công thức và có khoảng 80% số cây chuyển gen không dị dạng (bảng 3.11).

Bảng 3.12 Tổng hợp số cây tái sinh, kháng kháng sinh, mang gen và hữu thụ theo giống nền chuyển gen

Giống	Vector	Số cây tái sinh	Số cây kháng Hy. hoặc Ka.	Số cây mang gen		Số cây mang gen hữu thụ
				Chọn lọc	Đích	
Coker310	pCB301:*EPSPS*	72	33	35	17	16
	pCAMBIA1300:*EPSPS*	48	38	37	32	23
	pCB301:*bar*	75	27	19	19	16
	pCAMBIA1300:*bar*	52	41	32	32	23
Coker310FR	pCB301:*EPSPS*	90	46	32	24	19
	pCAMBIA1300:*EPSPS*	73	61	61	54	35
	pCB301:*bar*	103	52	43	31	28
	pCAMBIA1300:*bar*	79	68	52	45	39

Kết quả 2 thí nghiệm trên chỉ ra, giống bông không ảnh hưởng đến tỷ lệ cây chuyển gen không dị dạng nhưng giống ảnh hưởng rõ ràng đến hiệu quả chuyển gen, dòng Coker310FR có nhiều cây tái sinh và nhiều cây mang gen mục tiêu hơn giống

Coker310 (bảng 3.12). Bên cạnh đó, vector pCAMBIA có tỷ lệ cây mang gen cao hơn (66,4 - 73,8%), nhưng có nhiều cây dị dạng hơn (> 35% số cây) (bảng 3.10), vector pCB301 (bảng 3.11) cho tỷ lệ cây mang gen thấp hơn (23,6 - 30,2%) và tỷ lệ cây chuyển gen sinh trưởng, phát triển tốt cao hơn, trung bình đạt 80% số cây.

Số cây chuyển gen *bar* thế hệ T_0

190 cây kháng kháng sinh trong tổng số 337 cây tái sinh trên 2 giống và 2 vector được tổng hợp trong bảng 3.13. Kết quả đánh giá ở thế hệ này thu được 47 cây chuyển gen pCB301:*bar* và 69 cây chuyển gen pCAM:*bar*.

Cây chuyển gen pCB301:*bar* thu được nhiều cây (191 cây), tỷ lệ cây kháng kanamycin chiếm 45,0% (86/191 cây), tỷ lệ cây mang gen *npt*II đạt 29,8% (57 cây-hình đại diện 3.17A) và tỷ lệ cây mang gen *bar* đạt 29,3%, có 47 cây đồng thời mang gen *npt*II, *bar* và hữu thụ (Bảng 3.13). Sản phẩm PCR nhân gen *bar* của một số cây chuyển gen có sản phẩm rất đặc hiệu (hình 3.17C).

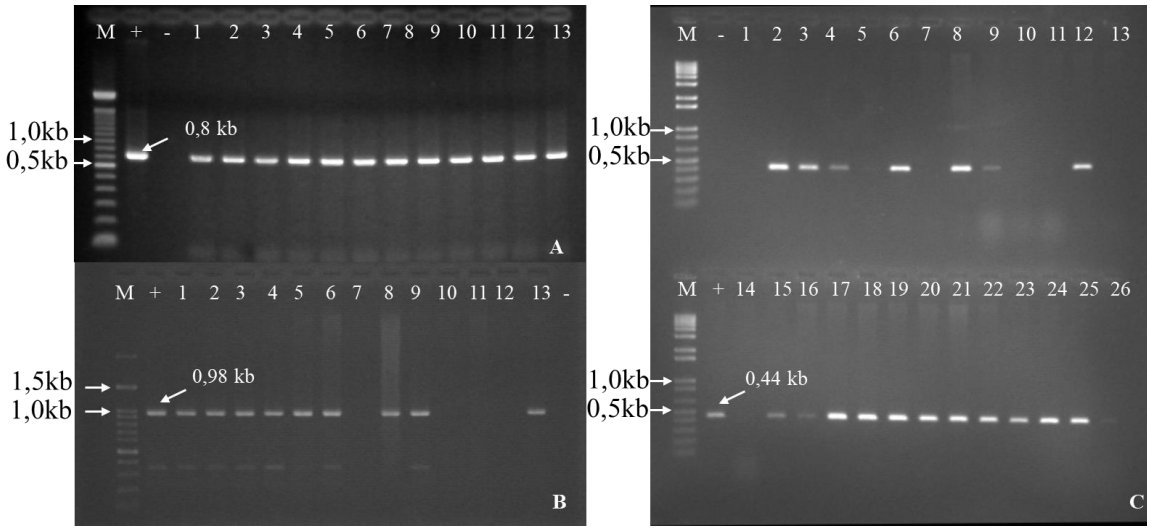
Bảng 3.13 Tổng hợp kết quả chọn lọc cây chuyển gen *bar* thế hệ T_0

Vector	Dòng/giống gốc	Số cây đánh giá	Số cây kháng kháng sinh	Số cây mang gen chọn lọc	Số cây mang gen *bar*	Số cây mang gen *bar* hữu thụ
pCB301:*bar*	Coker310	88	34	25	25	19
	Coker310FR	103	52	32	31	28
pCAM: *bar*	Coker310	67	44	44	34	30
	Coker310FR	79	60	60	45	39
Tổng		**337**	**190**	**161**	**135**	**116**

Cây chuyển gen pCAMBIA:*bar* thu được tổng số 146 cây, trong đó có 104 cây kháng hygromycin (chiếm 71,2%) và số cây kháng này đều mang gen *hpt* (hình 3.17B). Có 79 cây đồng thời mang gen *hpt* và gen *bar*, tỷ lệ cây hữu thụ đạt 69/79 cây (Bảng 3.13).

Số cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_0

Đánh giá tính tính kháng kháng sinh của cây chuyển gen *EPSPS* với 2 vector pCB301 và pCAMBIA1300 trên giống gốc Coker310 và dòng Coker310FR (Bảng 3.14) thu được 79 cây kháng kanamycin và 93 cây kháng hygromycin. Phân tích kết quả PCR kiểm tra sự hiện diện của gen đích *npt*II (Hình 3.18A), *hpt* (Hình 3.18B) và gen mục tiêu *EPSPS* (Hình 3.18C) đã xác định chọn được 96 cây hữu thụ đồng thời mang gen chọn lọc, gen *EPSPS*. Trong đó, 16 cây CE (coker310 chuyển gen pCB301:*EPSPS*), 19 cây CFE (coker310FR chuyển gen pCB301:*EPSPS*), 23 cây E (coker310 chuyển gen pCAM: *EPSPS*) và 35 cây CFE (coker310FR chuyển gen pCAM:*EPSPS*).



Hình 3.17 Sản phẩm PCR cây chuyển gen *bar* thế hệ T_0

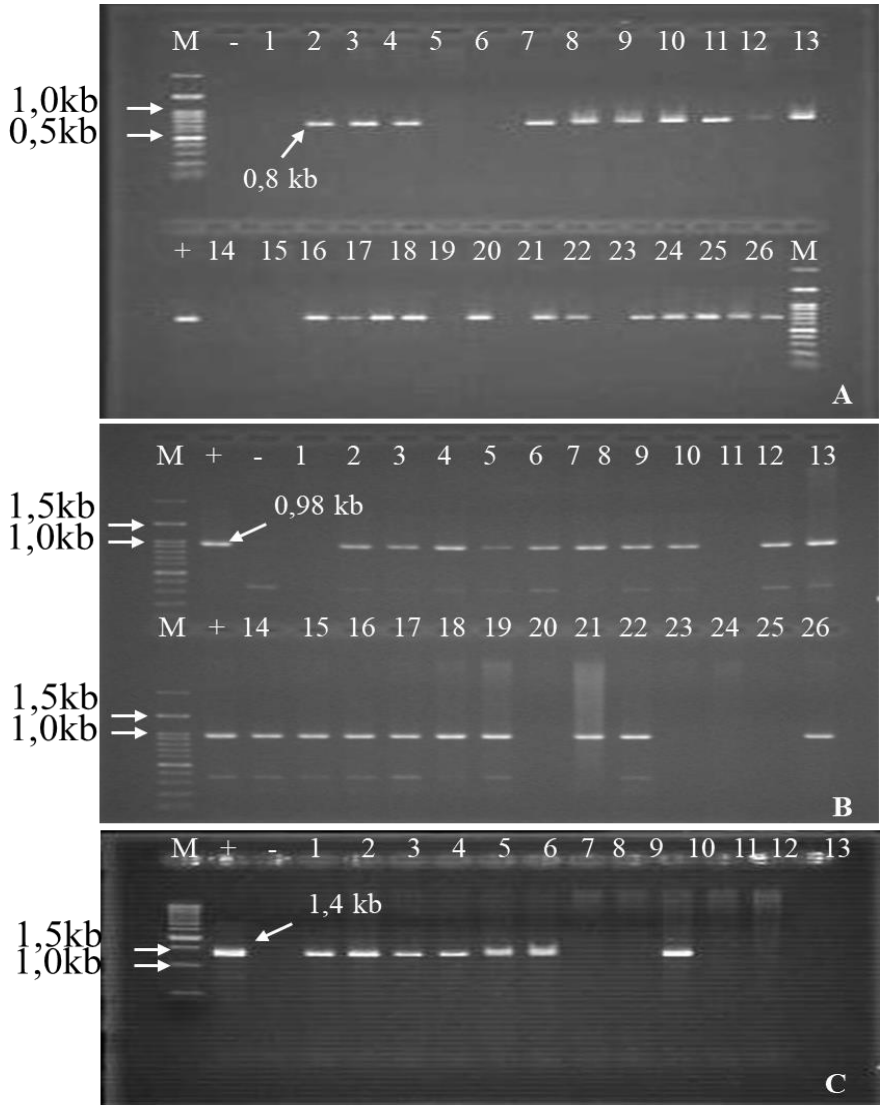
A: Kiểm tra gen *npt*II. (M) thang DNA chuẩn; (+): plamisd pCB301:*bar*; (-): Coker310; 1 - 13 cây chuyển gen

B: Kiểm tra gen *hpt*. (M) thang DNA chuẩn; (+): plamisd pCAMBIA1300:*bar*; (-): Coker310; 1 - 13 cây chuyển gen

C: (M) thang DNA chuẩn; (+): plamisd pCAMBIA1300:*bar*; (-): Coker310; 1 - 13 cây Coker310 chuyển gen; 14 - 26 cây Coker310FR chuyển gen.

Bảng 3.14 Tổng hợp kết quả chọn lọc cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_0

Vector	Dòng/giống gốc	Số cây đánh giá	Số cây kháng kháng sinh	Số cây mang gen chọn lọc	Số cây mang gen *EPSPS*	Số cây mang gen *EPSPS* hữu thụ
pCB301:	Coker310	83	33	25	21	16
EPSPS	Coker310FR	90	46	26	23	19
pCAM1300:	Coker310	57	38	38	38	23
EPSPS	Coker310FR	73	54	54	54	35
Tổng		**303**	**171**	**143**	**136**	**96**
Coker310			0	-	-	+
Coker310FR			0	-	-	+



Hình 3.18 Sản phẩm PCR gen *npt*II, hpt và *EPSPS* trong cây chuyển gen T_0

A: Kiểm tra gen *npt*II (M) thang DNA chuẩn; (+): plamisd pCB301:*EPSPS*; (-): Coker310; 1 - 13 cây Coker310 chuyển gen pCB301:*EPSPS*; 14 - 26 cây Coker310FR chuyển gen pCB301: *EPSPS*

B: Kiểm tra gen ***hpt***. (M) thang DNA chuẩn 100bp; (+): plamisd pCAMBIA1300:*EPSPS*; (-): Coker310; 1 - 13 cây Coker310 chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS*; 14 - 26 cây Coker310FR chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS*

C: Kiểm tra gen *EPSPS*. (M) thang DNA chuẩn 1kb; (+): plamisdpCB301:*EPSPS*; (-): Coker310; 1 - 13 cây chuyển gen.

3.2 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen chống chịu thuốc trừ cỏ

3.2.1 Chọn lọc cây chuyển gen *bar* chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate

3.2.1.1 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen bar thế hệ T_1

Bảng 3.15 Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng kháng sinh và chống chịu Glufosinate của cây chuyển gen *bar*

TT	Mô sẹo	T_0	Vector	Số cây mọc	Tỷ lệ kháng kháng sinh (%)	Tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			Số bản sao
						Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Mức độ	
1	barII2	CB3	pCB301	112	23,2	8	7,1	+++	1
2	barII2	CB15		95	29,5	11	11,6	+++	1
3	barIIF2	CFB2		73	16,4	11	15,1	+++	1
4	barIIF6	CFB6		107	31,8	15	14,0	+++	1
5	barIIF2	CFB18		42	31,0	9	21,4	+++	1
1	barI1	B1	pCAMBIA1300	132	79,5	82	62,1	+++++	1
2	barI2	B2		16	81,3	13	81,3	++++	2
3	barI3	B3		84	78,6	59	70,2	+++++	
4	barI2	B4		42	71,4	34	81,4	++++	2
5	barI3	B6		66	77,3	45	68,2	++++	1
6	barI4	B9		198	72,2	142	71,7	+++++	1
7	barI4	B18		111	36,9	36	32,4	+++++	1
8	barI3	B20		36	88,9	32	62,8	++++	
9	barIF3	BF8		102	61,8	52	51,0	+++++	
10	barIF2	BF12		91	45,1	36	39,6	++++	
11	barIF3	BF17		82	59,8	42	51,2	+++++	1
12	barIF4	BF25		42	78,6	30	71,4	+++	
	Coker310			35	0	0			

Hạt của 116 cây T_0 được gieo thành từng dòng, đánh giá tính chống chịu sinh, tính chống chịu thuốc trừ cỏ, chọn dòng chống chịu, xác định số bản sao gen chuyển bằng Southern blot (cho cây T_0 tương ứng). Kết quả phân tích tính kháng kháng sinh và chống chịu thuốc trừ cỏ của cây chuyển gen *bar* được tổng hợp trong bảng 3.15 và phụ lục 11.

Đánh giá tính kháng kanamycin cho 47 dòng mang gen *bar* hữu thụ cho thấy đều có khả năng kháng kanamycin. Tuy nhiên, tỷ lệ kháng ở thế hệ T_1 rất biến động 13,8 - 40,5% (bảng 3.15 và phụ lục 11.1). Trường hợp 1 bản sao gen sẽ cho tỷ lệ phân ly tính kháng:nhiễm ở T_1 là 3:1, nhưng hầu hết các dòng đều không đạt.

Đánh giá tính kháng hygromycin cho 69 dòng T_1 chuyển gen pCAM:*bar* được tổng hợp trong bảng 3.15 và phụ lục 11.2 cho thấy, tất cả các dòng đều kháng hygromycin. Tỷ lệ kháng rất khác nhau, biến động 16,7% (BF11 và BF23) - 100% (B12: có 2 cây mọc) cũng cho thấy cây T_1 chưa ổn định tính chống chịu sinh.

Kiểm tra sự có mặt của gen *bar* trong cây cho kết quả, gen *bar* cũng có mặt trong cây thế hệ T_1 kháng kanamycin và hygromycin (Hình 3.20A).

Đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ: Hạt của toàn bộ cây T_1 và cây đối chứng không chuyển gen được gieo trồng, sau đó xử lý với Glufosinate (nồng độ 0,6 kg ai./ha) ở giai đoạn 4 - 5 lá. Kết quả xử lý cho 47 dòng mang gen pCB301:*bar* chống chịu kanamycin thu được 18 dòng có cây chống chịu Glufosinate, nhưng tỷ lệ chống chịu rất thấp, cao nhất đạt 21,4% (Bảng 3.15 và phụ lục 11.1). Mức độ chống chịu của các dòng đều ở mức yếu - trung bình (Hình 3.19E), so với đối chứng là Coker310 và cỏ không thể phục hồi, cháy khô (Hình 3.19G). Những dòng này, sau khi phục hồi, sinh trưởng bình thường và hữu thụ. 03 dòng CB15, CFB2 và CFB6 có mức độ chống chịu tương tự CB3. 14 dòng có cây chống chịu là CB5, CB9, CB12, CB13, CFB12, CFB13, CFB14, CFB17, CFB18, CFB19, CFB21, CFB24, CFB26 và CFB27, nhưng mức độ chống chịu thuốc trừ cỏ đều ở mức kém. Dựa trên mức độ chống chịu thuốc của từng cây, chọn được 4 dòng là CB3, CB15, CFB2 và CFB6 có mức độ chống chịu tốt hơn cả.



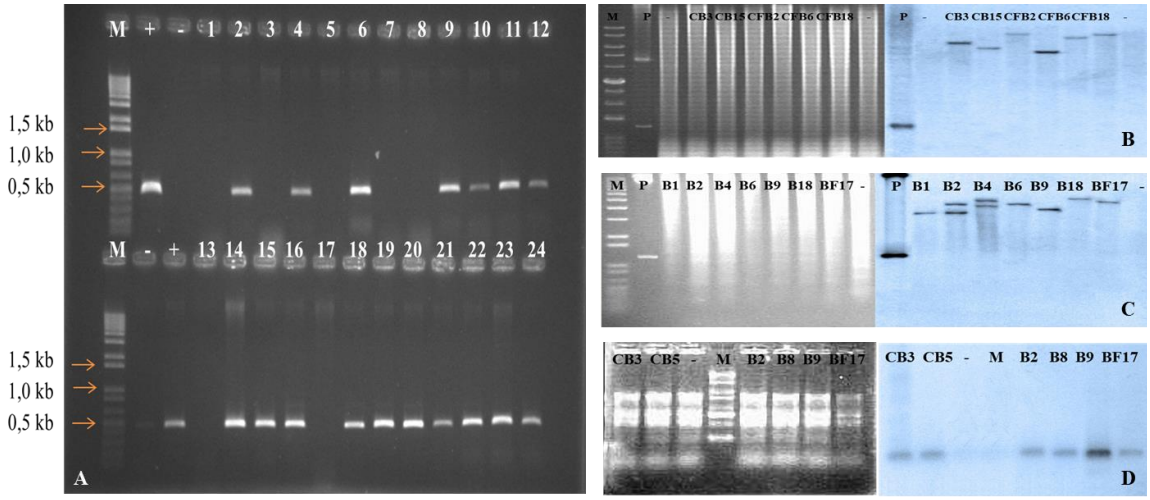
Hình 3.19 Cây bông chuyển gen *bar* thế hệ T_1 trước và sau khi xử lý thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate (nồng độ 0,6 kg ai./ha), xử lý ở giai đoạn 4 - 5 lá.

A: Trước khi xử lý; B: Sau xử lý thuốc trừ cỏ; C: Dòng không chống chịu; D, E: Dòng và cây chống chịu thuốc trừ cỏ ở mức kém; F: Dòng và cây chống chịu thuốc trừ cỏ ở mức cao; và G: đối chứng không chống chịu.

Kết quả xử lý Glufosinate cho 69 dòng T_1 chuyển gen pCAMBIA:*bar* thu được 48/69 dòng có cây chống chịu Glufosinate và mức độ chống chịu của các dòng ở mức cao (bảng 3.15 và phụ lục 11.2). Có sự khác biệt rõ ràng về mức độ chống chịu của các dòng B (pCAMBIA1300:*bar*) với CB (pCB301:*bar*), mặc dù vùng gen PNOS-*bar*-TNOS của 2 vector chuyển gen là như nhau, số lượng cây mang gen tái sinh từ 2 vector này cũng khá tương đương nhau nhưng rõ ràng, các dòng B (pCAMBIA1300:*bar*) có mức độ chống chịu Glufosinate tốt hơn. Đối với các dòng có tỷ lệ sống:chết xấp xỉ 3:1 tương đương tỷ lệ dự kiến cho một gen trội duy nhất trong quần thể tự thụ phấn.

Việc áp dụng một loại thuốc trừ cỏ như Glufosinate ammonium có thể gây ra các phản ứng nhạy cảm khác nhau trong cỏ dại, chủ yếu là do tính biến đổi di truyền rộng của chúng. Sự nhạy cảm khác nhau có thể được giải thích bằng sự khác biệt trong chuyển vị, hấp thu và chuyển hóa thuốc trừ cỏ (Everman và ctv, 2009). Bên

cạnh đó, các yếu tố dẫn đến di truyền phi Mendel là kểu gen cây nhận đột biến do phương pháp chuyển gen, bất thường nhiễm sắc thể, allen không tương đồng, do sự tích hợp gen chuyển không ổn định hoặc im lặng gen chuyển, có thể do tương tác giữa gen chuyển và genome cây nhận (truyền gen kém, trao đổi chéo, không tương hợp nên không có đồng hợp tử) (Zhang và ctv, 2005).



Hình **3.20** Đánh giá các dòng chuyển gen *bar* thế hệ T_1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử

A: Sản phẩn PCR gen *bar* trong cây chuyển gen. M: thang DNA chuẩn; (+): plamisd pCAMBIA1300:*bar*; (-): Coker310; 1-24 cây chuyển gen.

B: Southern blot. (M): thang DNA chuẩn 1 kb; P: plamid pCB301:*bar*/*Pst*I (+) *Eco*RI; 1: (-) Coker310; CB3, CB15, CFB2, CFB6 và CFB18: dòng chuyển gen.

C: Southern blot. (M): thang DNA chuẩn 1 kb; P: plamid pCAMBIA:*bar*/*Pst*I (+) *Eco*RI; B1, B2, B4, B6, B9, B18 và BF17: dòng chuyển gen; (-): Coker310.

D: Northern blot. (M): Thang RNA chuẩn 0,5 kb; CB3, CB5, B2, B8, B9 và BF17: dòng chuyển gen; (-): Coker310.

Để chắc chắn tính chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate được tạo ra bởi gen chuyển cần kiểm tra sự có mặt của gen *bar*, kết quả là gen *bar* có mặt trong cây chuyển gen thế hệ T_1 (Hình 3.20A). Kiểm tra sự gắn kết của gen chuyển bằng Southern blot cho thấy 10 dòng chuyển gen giả định là CB3, CB15, CFB2, CFB6, CFB16, B1, B6, B9, B18 và BF17 mang 1 bản sao, 2 dòng B2, B4 mang 2 bản sao. Trên đối chứng không chuyển gen Coker310 không phát hiện băng lai (Hình 3.20B, C). Kết quả này cũng xác nhận kết quả PCR và chỉ ra sự tích hợp của vùng T-DNA

trong gemome cây chuyển gen. Sự xuất hiện băng lai giữa mẫu dò là cDNA từ cây chuyển gen với RNA tổng số của 6 dòng CB3, CB5, B2, B8, B9 và BF17 (Hình 3.20D) cho thấy có hoạt động phiên mã của gen chuyển.

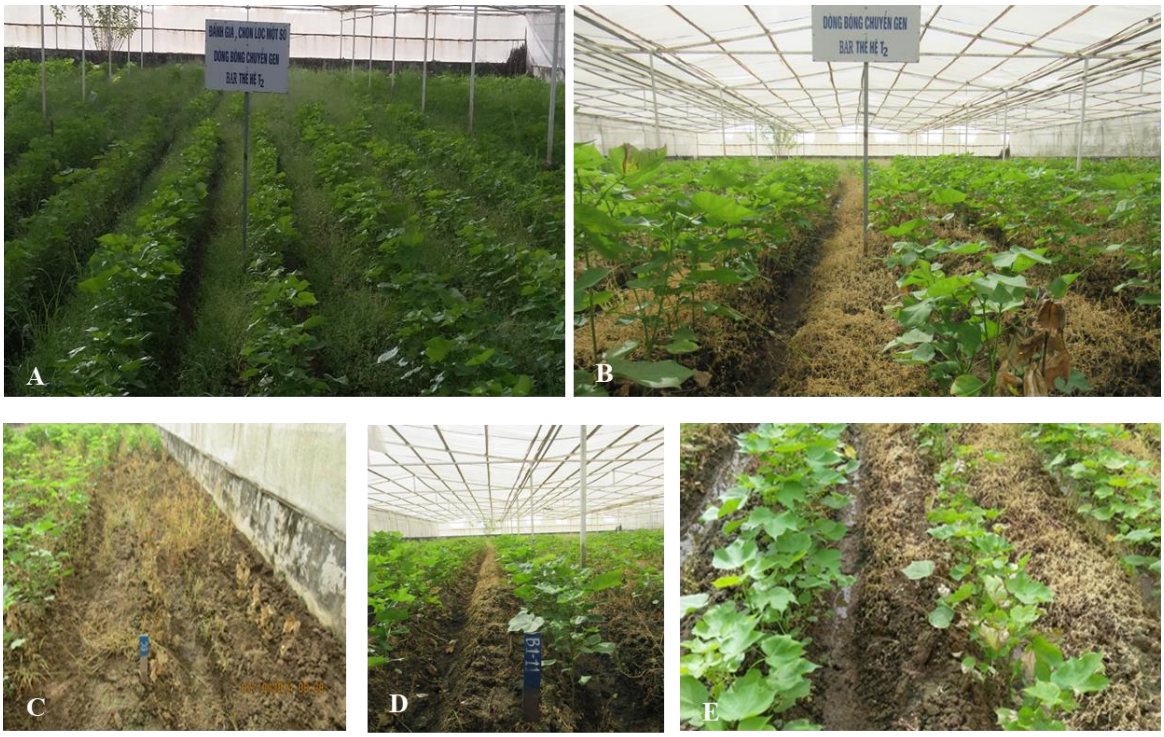
3.2.1.2 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen bar thế hệ T_2

Thử nghiệm sinh học về khả năng chịu thuốc trừ cỏ ở cả cây chuyển gen và không chuyển gen thế hệ T_2 cũng được áp dụng với Glufosinate. Lá của những cây không được biến đổi gen bị cháy (hình 3.21C), trong khi những cây của cây biến đổi gen không có triệu chứng như vậy (Hình 3.21B). Hình 3.21A cho thấy, trước khi phun thuốc cây bông và cỏ phát triển rất tốt, sau phun Glufosinate với nồng độ 0,6 kg ai./ha làm cho cỏ và đối chứng là Coker310 chết hoàn toàn (Hình 3.21C) và cây bông không bị ảnh hưởng(Hình 3.21B). Mức độ chống chịu của các dòng có khác nhau, chống chịu cao (Hình 3.21D) và chống chịu trung bình (Hình 3.21E). Năm dòng B1, B9, B18 và BF8, BF17 thể hiện mức độ chống chịu cao và ổn định.

Bảng 3.16 Tỷ lệ (%) cây chống chịu Glufosinate của các dòng bông chuyển gen *bar* thế hệ T_2

TT	Dòng	Số đầu dòng đánh giá	Tỷ lệ (%) chống chịu	Dòng không phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ
1	B1	11	82,3-100	B1-1, B1-11
2	B3	7	82,5-100	B3-3, B3-4
3	B6	6	78,2-100	B6-6
4	B9	17	75,8-100	B9-3
5	B18	5	77,1-100	B18-1
6	B20	4	73,7-98,9	
7	BF3	6	77,4-100	BF3-2
8	BF8	10	70,6-97,5	
9	BF12	5	78,7-93,9	
10	BF17	8	72,3-100	BF17-1
11	BF25	5	73,8-95,7	
	Coker310		0	

Đánh giá cây bông chuyển gen *bar* ở thế hệ T_2 bằng thuốc trừ cỏ cho thấy các dòng đều có tỷ lệ cây chống chịu thuốc trừ cỏ rất cao (Bảng 3.16). Một số dòng như B1-1, B1-11, B3-3, B3-4, B6-6, B9-3, B18-1, BF3-2, BF17-1, có tỷ lệ chống chịu thuốc trừ cỏ là 100%, khả năng thuần về tính chống chịu thuốc trừ cỏ rất cao. Hơn nữa, so sánh hai vector chuyển gen cho thấy cả hai đều có thể được sử dụng để biến đổi gen trên bông, tuy nhiên, liên quan đến chống chịu thuốc Glyphosate và Glufosinate, hiệu quả chuyển gen và tỷ lệ cây chống chịu tốt hơn đạt được ở pCAMBIA1300.



Hình 3.21 Dòng bông chuyển gen *bar* thế hệ T_2 xử lý Glufosinate ở giai đoạn 7 - 8 lá, liều lượng 0,6kg a.i/ha.

(A) trước khi phun, (B) sau phun 5 ngày, (C) đối chứng không chuyển gen Coker310, (D) Khu vực có dòng chống chịu cao (bên trái) và dòng chống chịu trung bình (bên phải).

3.2.2 Chọn lọc cây chuyển gen *EPSPS* chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate

3.2.2.1 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen EPSPS thế hệ T_1

Đánh giá tính kháng kanamycin cho 35 dòng chuyển gen pCB301:*EPSPS* đã được đánh giá tính kháng kanamycin và kiểm tra sự hiện diện của gen *EPSPS* trong

cây T1. Tỷ lệ kháng kanamycin biến động lớn từ 16,7% (CE35) đến 81,8% (CE28) (Bảng 3.17 và Phụ lục 12.1).

Bảng 3.17 Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng kháng sinh và chống chịu thuốc trừ cỏ Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1

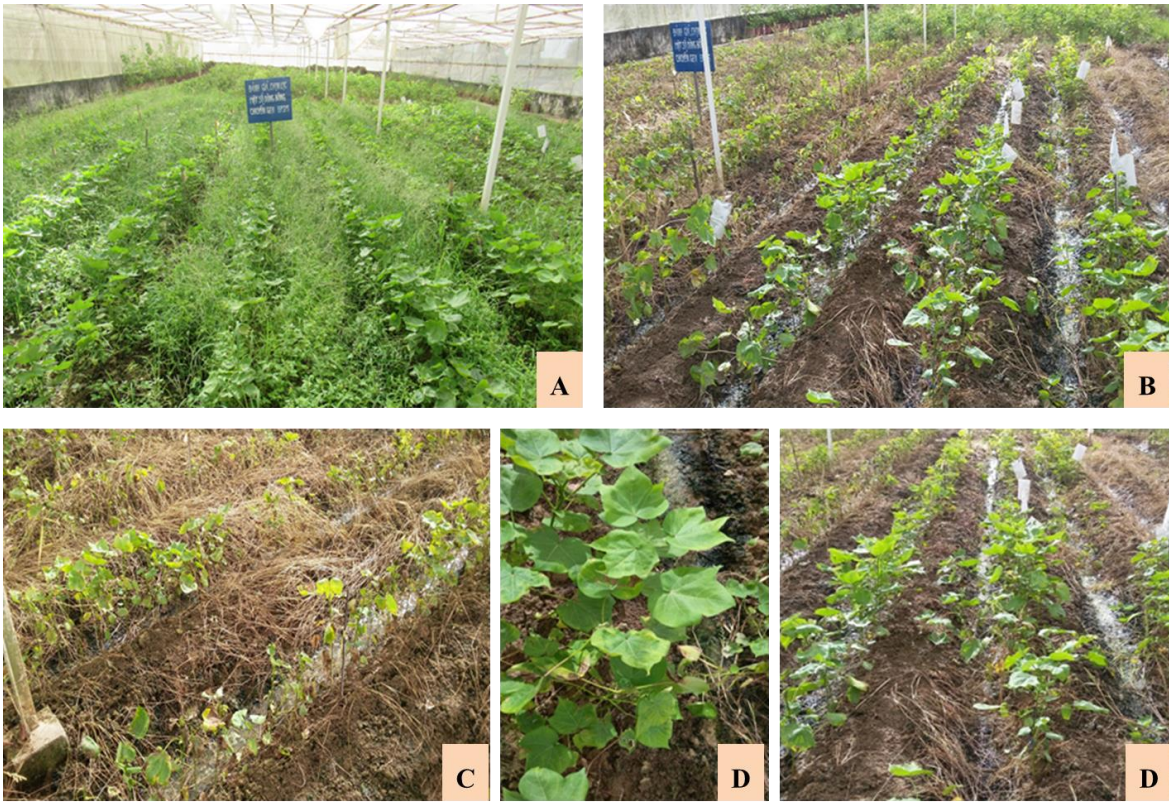
Giống nền	Mô sẹo	T_0	Vector	Số cây mọc	Tỷ lệ kháng kháng sinh (%)	Tính chống chịu (2,88 kg ai./ha)			Số bản sao
						Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Mức độ	
Coker310	EPSII4	CE5	pCB301	31	80,6	12	38,7	++	K rõ
Coker310	EPSII4	CE9	pCB301	39	66,7	16	41,0	++	1
Coker310FR	EPSIIF1	CFE1	pCB301	111	36,9	36	32,4	++	1
Coker310FR	EPSIIF3	CFE16	pCB301	41	63,4	19	46,3	++	1
Coker310	EPSI2	E7	pCAMBIA1300	19	73,7	11	57,9	+++	1
Coker310	EPSI3	E8	pCAMBIA1300	26	46,2	10	38,5	+++	1
Coker310FR	EPSI7	E19	pCAMBIA1300	31	71,0	17	54,8	+++	1
Coker310FR	EPSIF4	EF4	pCAMBIA1300	47	61,7	22	46,8	+++	1
Coker310FR	EPSIF4	EF14	pCAMBIA1300	22	77,3	12	54,5	+++	1
Coker310FR	EPSIF8	EF25	pCAMBIA1300	17	76,5	11	64,7	+++	*
Coker310						0	0	-	

Ghi chú: (*) không đánh giá; K rõ: Không rõ band trên film X-ray

Đánh giá tính kháng hygromycin cho 58 dòng chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS* và kiểm tra sự có mặt của gen *EPSPS* trong cây T_1 cho thấy, cả 58 dòng đều kháng hygromycin (Bảng 3.17. và Phụ lục 12.2), nhiều dòng có sự phân ly tính kháng:nhiễm hygromycin theo tỷ lệ tương đương 3:1 như E1, E13, E15, E19, EF3, EF7, EF14, EF25 và EF31 (tỷ lệ kháng hygromycin 64,3 - 76,5%) có khả năng mang 1 bản sao gen chuyển. Những dòng còn lại có tỷ lệ kháng không theo quy

luật, đa số dòng có tỷ lệ kháng rất thấp. PCR kiểm tra sự có mặt của gen *hpt* trong cây kháng đều có kết quả dương tính. Như vậy, biểu hiện của gen chuyển là chưa ổn định, tỷ lệ cây không mang gen cao hơn dự tính.

Kết quả đánh giá tính chống chịu Glyphosate (phun thuốc trừ cỏ Roundup 480SC ở liều lượng 2,88 kg ai./ha,15 ml/l nước, phun 4 lít/100m2) trình bày trong bảng 3.14 và phụ lục 12.2.

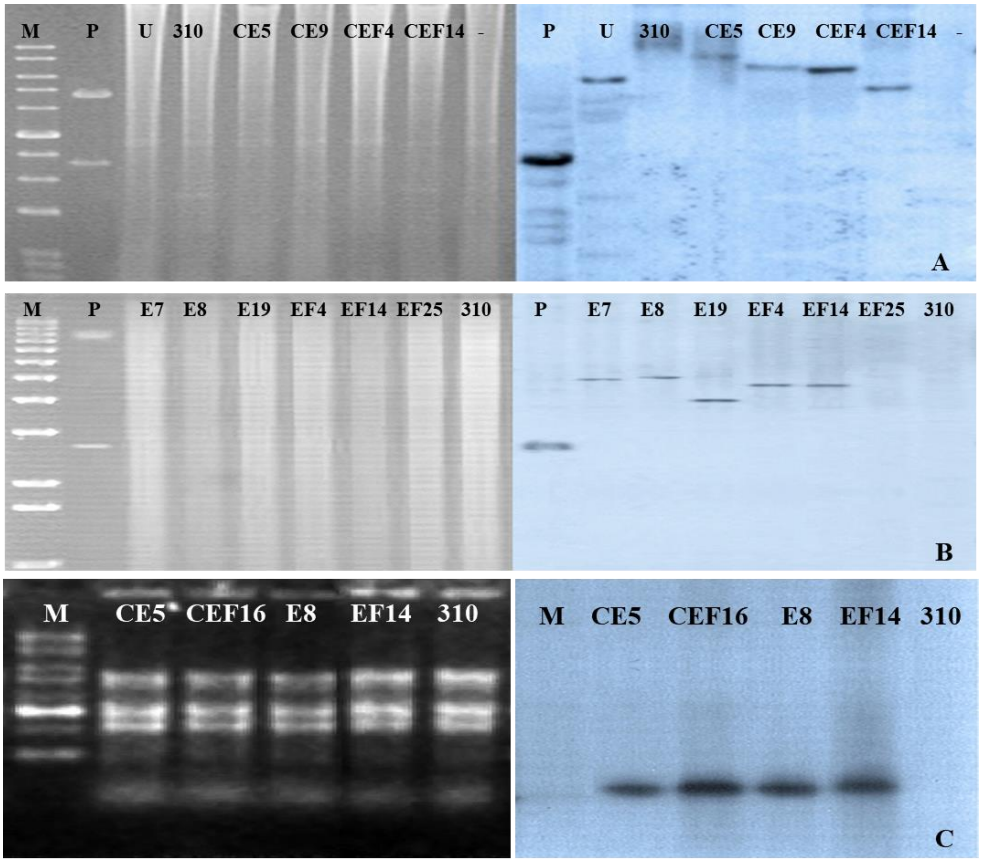


Hình 3.22 Dòng bông chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1 chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glyphosate, triệu chứng ở giai đoạn 10 ngày sau xử lý.

(A) Trước phun, (B) Sau phun 10 ngày, (C) Dòng không chống chịu, (D) Cây chống chịu trung bình (E) Dòng chống chịu

+ 18 dòng có cây kháng (bảng 3.17 và phụ lục 12.2) từ 35 dòng chuyển gen pCB301:*EPSPS*, tỷ lệ cây sống khá thấp từ 8,8% (CE14) đến 47,7% (CE21). Có 2 dòng cho nhiều cây sống, mức độ chống chịu tốt hơn cả, đồng đều giữa các cây và có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh là CE5 và CEF16. Hình 3.22 là kết quả đánh giá tính chống chịu thuốc Glyphosate cho các dòng CEF16, trước khi phun (A), cỏ dại rất nhiều, sinh trưởng lấn át cây bông, sau khi phun thuốc ở nồng độ 2,88 kg ai./ha

(cao hơn liều khuyến cáo cho cỏ thường niên 1,92 kg ai./ha), cỏ đã chết hoàn toàn (B), nhiều dòng bông không chống chịu có biểu hiện úa vàng, rụng lá và chết (C) và một số dòng có cây chống chịu (D, E). Trong cùng dòng, mức độ chống chịu của từng cây khác nhau (D), cây chống chịu yếu có biểu hiện sinh trưởng kém.



Hình 3.23 Đánh giá các dòng chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử

A: Kết quả Southern blot gen *EPSPS* trong các dòng chuyển gen pcB301:*EPSPS*. (M) thang DNA chuẩn, (P) plasmid pCB301:*EPSPS*/*Hin*dIII + *Eco*RI; (310) giống Coker310; (CE5, CE9, CEF4, CEF14) các dòng chuyển gen và (-) Coker310FR

B: Kết quả Southern blot gen *EPSPS* trong các dòng chuyển gen pCAMBIA:*EPSPS*. (M) thang DNA chuẩn, (P) plasmid pCAM:*EPSPS*/*Hin*dIII (+) *Eco*RI; (E7; E8, E19, EF4, EF14, EF25 và 7: Coker310

C: Kết quả Northern blot gen *EPSPS*. (M) thang RNA chuẩn, (CE5, CEF16, E8, và EF14) các dòng chuyển gen thế hệ T_1 và Đ/C-: Coker310

+ 22 dòng có cây sống từ 58 dòng chuyển gen pCAM:*EPSPS* (Bảng 3.17 và phụ lục 11.2). Sáu dòng vừa có nhiều cây sống, cây sinh trưởng đồng đều và có mức độ chống chịu tốt nhất là là E7, E8, E19, EF4, EF14 và EE25.

9 dòng CE5 và CE9 (pCB301/Coker310), CEF1 và CEF16 (pCB301/Coker310FR), E7, E8 và E9 (pCAMBIA1300/Coker310), EF4 và EF14 (pCAMBIA1300/Coker310FR và cùng mô sẹo phát sinh phôi) được đánh giá bằng kỹ thuật Southern blot. Kết quả, xác định được các dòng có 1 bản sao (Hình 3.23A, B), kết quả cho dòng CE5 không rõ (hình 3.23A).

4 dòng CE5, CEF16, E8 và EF14 chống chịu thuốc trừ cỏ Roundup 480SC được kiểm tra lại bằng kỹ thuật Northen blot để kiểm chứng có hoạt động phiên mã của gen. Kết quả lai giữa mẫu dò là cDNA từ cây chuyển gen với RNA tổng số có xuất hiện băng lai (hình 3.23C).

3.2.2.2 Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen EPSPS thế hệ T_2

Bảng 3.18 Tỷ lệ (%) cây chống chịu thuốc trừ cỏ Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2

TT	Dòng	Số đầu dòng đánh giá	Tỷ lệ (%)	Dòng không phân ly tính kháng
1	E8	2		E8-2, E8-7
2	E19	2	70,8; 71,1	
3	EF4	2	73,7; 77,9	
4	EF14	4		E37-1, E37-4, E37-8, E37-10
5	EF25	2	65,9; 71,9	
6	CE5	3	74,9-91,4	
7	CE9	4	49,0-100	CE9-2
8	CEF1	13		CE17-12
9	CEF16	7	46,7-95,1	
	Coker310		0	

Tiếp tục đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ cho cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2 để chọn được cây mang gen ổn định, chống chịu tốt với thuốc trừ cỏ. Để có được các kết quả như dự định, sau khi đánh giá tính chống chịu thuốc trừ cỏ cho con lai từ những cây T_1, các hạt tự thụ của những cây này cũng được gieo ra. Số liệu thu được trong bảng 3.15 cho thấy, các dòng E8-2, E8-7, EF14-1, EF14-4, EF14-8, EF14-10, CE9-2 và CEF1-2 đều có tỷ lệ cây kháng kháng sinh và thuốc trừ cỏ Glyphosate là 100%, như vậy các dòng này đã thuần, chọn cây đẹp để tự thụ thu quả.

Những dòng có tỷ lệ chống chịu Glyphosate xấp xỉ 3:1 (gần 75% cây sống), cho thấy trước đó, thế hệ T_1 đang ở trạng thái dị hợp tử. Kết quả này hỗ trợ kết quả southern là đơn copy gen chuyển (Bảng 3.15 và phụ lục 11.3).



Hình 3.24 Dòng bông chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2 chống chịu Glyphosate, triệu chứng ở giai đoạn 10 ngày sau xử lý

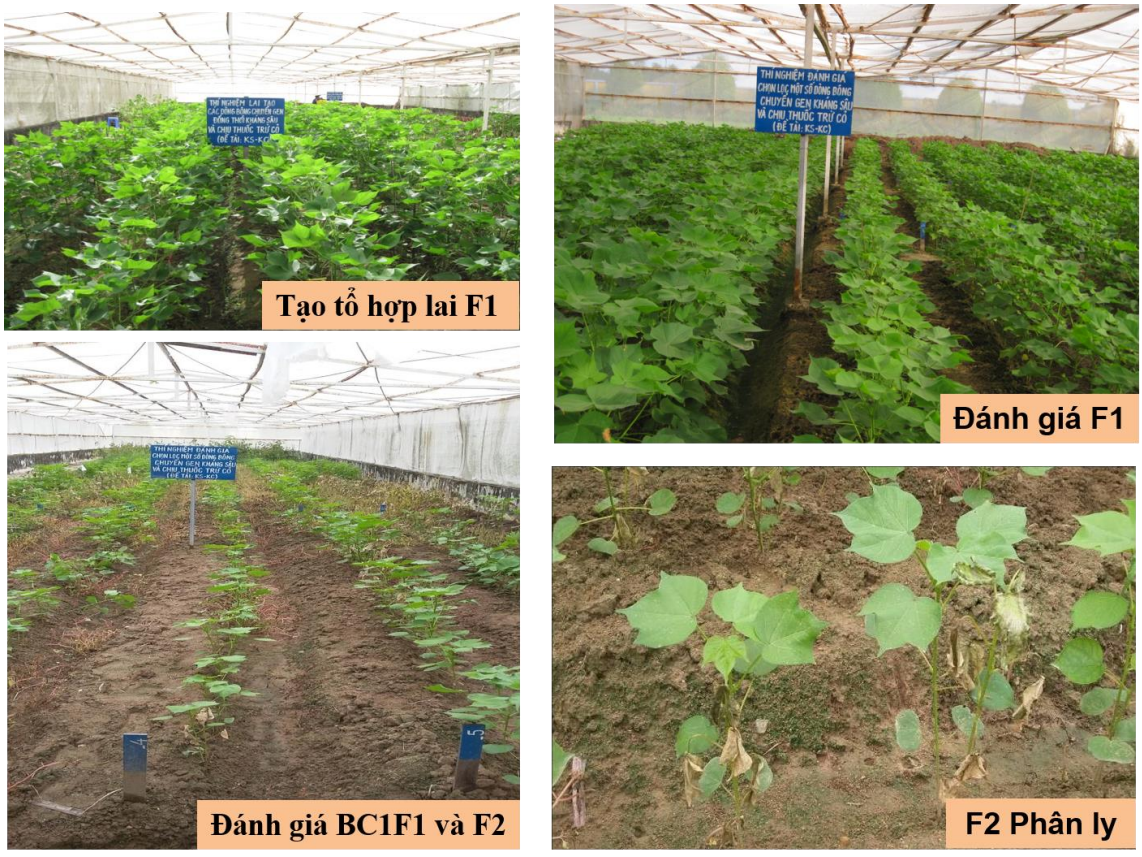
Kết quả thu nhận trong bảng 3.18 và phụ lục 12.3 cũng chỉ ra những dòng còn phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ đều cho tỷ lệ cây sống cao hơn T_1, biến động

30,9-97,9%, cho thấy gen chuyển đã ổn định hơn trong cây chuyển gen. Tỷ lệ phân ly khác biệt rõ ràng giữa T_1 và T_2, ở T_1 tỷ lệ cây chết cao hơn, ở T_2 tỷ lệ cây sống cao hơn.

Về mức độ chống chịu, những dòng chọn chỉ ở mức trung bình, hầu hết cây sống sót có lá bị cong mép, hoại tử một phần (hình 3.24) sau khi xử lý với Glyphosate 480 SC, liều lượng 2,88kg/ha. Như vậy, so với mục tiêu là chống chịu cao thì các dòng chuyển gen *EPSPS* chưa đạt yêu cầu. Vì vậy, đề tài không đánh giá các dòng này về đặc điểm nông sinh học và tính mẫn cảm với bệnh hại chính trên cây bông.

3.3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate, các đặc điểm thực vật học và khả năng mẫm cảm với một số bệnh hại chính của cây bông chuyển gen thế hệ T_2

3.3.1 Di truyền tính chống chịu thuốc trừ cỏ của các dòng chuyển gen *bar*



Hình 3.25 Thí nghiệm phân tích di truyền gen chuyển trong cây bông chuyển gen

Để làm sáng tỏ sự di truyền tính trạng thuốc trừ cỏ của B9 và BF17, phân tích di truyền cho tính trạng này đã được thực hiện (Bảng 3.19). Các tổ hợp lai F1 được tạo ra là B9×MCU9 (30 cây), MCU9×B9 (96 cây), B9×Coker310 (52 cây) và Coker 310×B9 (37 cây) chống chịu hoàn toàn với Glufosinate, chứng tỏ rằng tính trạng chống chịu là trội và không bị ảnh hưởng bởi di truyền đường mẹ (Zhang và ctv, 2005). 36 cây sống 12 cây chết ở quần thể F2 B9×MCU9 phân ly theo tỷ lệ chuẩn 3:1. Phân ly sống chết ở quần thể F2 từ cặp lai Coker310 ×B9 cũng đã xác nhận tỷ lệ xấp xỉ 3:1 ($\chi 2$=0.008). Tỷ lệ phân ly của quần thể backcross (B9 × MCU9) × MCU9 và (B9 × Coker310) × Coker310 đều là 1:1, khi phân tích $\chi 2$. Như vậy, kết quả trong bảng về quần thể F2 từ các cặp lai khác nhau đều chỉ ra mô hình di truyền đơn gen.

Bảng 3.19 Phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate của dòng B9

TT	Cặp lai	Tổng cây	Số cây sống	Tỷ lệ sống (%)	Số cây chết	Tỷ lệ phân ly sống: chết	Cây sống dự kiến	Cây chết dự kiến	χ^2
1	B9 × MCU9 (F1)	30	30	100					
2	MCU9 × B9 (F1)	96	96	100					
3	B9 × Coker 310 (F1)	52	52	100					
4	Coker310 × B9 (F1)	37	37	100					
5	B9 × MCU9 (F2)	48	36	75,0	12	3,00	36,0	12,0	0,000
6	MCU9 × B9 (F2)	51	39	76,5	12	3,25	38,3	12,8	0,059
7	B9 × Coker 310 (F2)	43	33	76,7	10	3,30	32,3	10,8	0,070
8	Coker310 × B9 (F2)	43	32	74,4	11	2,91	32,3	10,8	0,008
9	(B9 × MCU9) × MCU9	43	22	51,2	21	1,05	21,5	21,5	0,023
10	(B9 × Coker 310) × Coker 310	41	21	51,2	20	1,05	20,5	20,5	0,024

$P_{0,05}$=3,841

Tương tự B9, con lai với BF17 không phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ cũng được tự thụ và hồi giao các tổ hợp được chọn này và đánh giá tính chống chịu thuốc

trừ cỏ ở F2 và BC1F1 để khẳng tính di truyền của gen chống chịu thuốc trừ cỏ trong dòng BF17. Kết quả đánh giá ghi nhận ở bảng 3.20 cho tỷ lệ phân ly tính kháng nhiễm thuốc trừ cỏ đúng như dự đoán ở F2 là 3:1 và BC1F1 là 1:1, giá trị $\chi 2$ đều nằm trong khoảng cho phép. Do đó, dòng BF17 có mô hình di truyền đơn gen.

Tính ổn định của chèn T-DNA được đánh giá bằng phân tích Southern blot. Kết quả đã chứng minh rằng 2 dòng B9 và BF17 tích hợp đơn copy được duy trì qua hai thế hệ nhân giống (T_1). Phân tích Chi bình phương dựa trên việc kiểm tra tỷ lệ phân ly quan sát được với tỷ lệ phân ly dự kiến theo quy luật Mendel đã được thực hiện bằng cách phân tích con lai F2 và BC1F1của Coker310/B9 và Coker310/BF17. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho phép chọn được thể đồng hợp tử gen chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate.

Bảng 3.20 Phân ly tính chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate của dòng BF17

TT	Cặp lai	Tổng cây	Số cây sống	Tỷ lệ sống (%)	Số cây chết	Tỷ lệ phân ly sống: chết	Cây sống dự kiến	Cây chết dự kiến	χ^2
1	BF17 × MCU9 (F1)	53	53	100					
2	MCU9 × BF17 (F1)	75	75	100					
3	BF17 × Coker 310 (F1)	37	37	100					
4	Coker310 × BF17 (F1)	71	71	100					
5	BF17 × MCU9 (F2)	49	38	77,6	11	3,45	36,8	12,3	0,170
6	MCU9 × BF17 (F2)	43	31	72,1	12	2,58	32,3	10,8	0,194
7	BF17 × Coker 310 (F2)	55	42	76,4	13	3,23	41,3	13,8	0,055
8	Coker310 × BF17 (F2)	33	26	78,8	7	3,71	24,8	8,3	0,253
9	(BF17 × MCU9) × MCU9	38	20	52,6	18	1,11	19	19	0,105
10	(BF17 × Coker 310) × Coker 310	43	22	51,2	21	1,05	21,5	21,5	0,023

$P_{0,05}$=3,841

Kết quả phân ly tính kháng hỗ trợ kết luận cassette biểu hiện protein *bar* trong 2 dòng B9 và BF17 là 1 bản sao và phù hợp cho mục tiêu tạo giống chống chịu thuốc trừ cỏ gốc Glufosinate sau này. Bởi vì dòng Coker không được trồng phổ biến, tính trạng chống chịu phải được chuyển qua các giống có năng sất cao hơn, thích nghi tốt hơn bằng phương pháp lai trở lại (Perlak và ctv, 1990). Kết quả này cũng khẳng định, gen chuyển trong dòng B9 và BF17 đã ở dạng đồng hợp tử, phù hợp với mục tiêu lai tạo.

3.3.2 Đánh giá kiểu hình, đặc điểm nông học và tính mẫn cảm với bệnh hại của cây chuyển gen thế hệ T_2

Mức độ tương đồng về các đặc điểm thực vật học của cây chuyển gen và giống nền không chuyển gen là những chỉ tiêu đầu tiên cần đánh giá đối với các nguy cơ môi trường của cây chuyển gen (OECD, 2008). Kết quả so sánh các đặc điểm nông sinh học và hình thái chính của các dòng bông chuyển gen *bar* so với giống bông nền Coker310 được trình bày trong bảng 3.21.

Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt ở mức thống kê ($P \geq 0,055$) giữa các dòng bông chuyển gen *bar* (B9 và BF17) với đối chứng Coker310 không chuyển gen về các đặc điểm nông sinh học, gồm tỷ lệ nảy mầm, sức mọc mầm, thời gian sinh trưởng từ gieo đến nở hoa, thời gian sinh trưởng từ gieo đến nở quả, số cành quả/cây, số cành đực/cây, vị trí cành quả 1, khối lượng quả, số quả/cây.

Kết quả thu được trong bảng 3.21 cho thấy sự đồng nhất về các đặc điểm hình thái (chiều cao cây, hình dạng thân, màu sắc thân, hình dạng lá, màu sắc lá, màu sắc cánh hoa, màu sắc phấn hoa, hình dạng quả) giữa các dòng bông chuyển gen *bar* với giống nền Coker310 không chuyển gen. Như vậy, không có sự khác biệt giữa các dòng bông chuyển gen *bar* và đối chứng không chuyển gen về các đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển.

Mức độ mẫn cảm đối với các loại bệnh hại chủ yếu là một trong những tiêu chí quan trọng đánh giá khả năng thích nghi với các điều kiện ngoại cảnh và xác định năng suất của giống ở điều kiện sinh thái mới. Đề tài đã tiến hành đánh giá mức độ mẫn cảm của các dòng bông chuyển gen *bar* đối với một số bệnh hại chính trên cây bông như lở cổ rễ, mốc trắng, đốm cháy lá. Kết quả tổng hợp trong bảng 3.21 cho

thấy, mức độ nhiễm bệnh lở cổ rễ là tương đương nhau giữa các dòng bông chuyển gen và đối chứng không chuyển gen (P ≥ 0,195).

Bảng 3.21 So sánh các đặc điểm nông sinh học, hình thái và tính mẫn cảm với bệnh hại của các dòng bông chuyển gen *bar* với giống bông nền Coker310

TT	Chỉ tiêu theo dõi	B9	BF17	Coker310	P
1	Tỷ lệ nảy mầm (%)	90,4	92,7	90,4	0,678
2	Sức mọc mầm (%)	88,5	87,4	88,9	0,949
3	Thời gian từ gieo đến nở hoa (ngày)	52,3	53,0	53,0	0,055
4	Thời gian từ gieo đến nở quả (ngày)	102,3	104,3	104,0	0,089
5	Số cành quả/cây	8,9	8,9	9,5	0,148
6	Số cành đực/cây	1,6	2,0	2,0	0,084
7	Số đốt tới cành quả 1	5,7	5,6	5,5	0,057
8	Chiều cao cây (cm)	115,5	120,5	112,5	0,061
9	Hình dạng thân	Hình tháp	Hình tháp	Hình tháp	-
10	Màu sắc thân	Xanh nhạt	Xanh nhạt	Xanh nhạt	-
11	Hình dạng lá	Xẻ thùy nông	Xẻ thùy nông	Xẻ thùy nông	-
12	Màu sắc lá	Xanh TB	Xanh TB	Xanh TB	-
13	Màu sắc cánh hoa	Trắng ngà	Trắng ngà	Trắng ngà	-
14	Màu sắc phấn hoa	Trắng ngà	Trắng ngà	Trắng ngà	-
15	Dạng quả	Hình trứng	Hình trứng	Hình trứng	-
16	Khối lượng quả (g)	4,9	5,0	4,9	0,289
17	Số quả/cây	10,4	10,6	11,6	0,148
18	Tỷ lệ bệnh (%) lở cổ rễ	86,7	88,9	93,3	0,781
19	Chỉ số bệnh (%) lở cổ rễ	24,4	22,7	21,3	0,836
20	Tỷ lệ bệnh (%) đốm cháy lá	100	100	100	-
21	Chỉ số bệnh (%) đốm cháy lá	52,4	53,8	50,2	0,794
22	Tỷ lệ bệnh (%) mốc trắng	64,4	71,1	73,3	0,731
23	Chỉ số bệnh (%) mốc trắng	16,4	18,7	20,0	0,789

Các đánh giá về kiểu hình, đặc điểm nông học và tính mẫn cảm với bệnh hại giữa cây trồng chuyển gen và cây trồng truyền thống không chuyển gen có thể hỗ trợ kết luận có hay không nguy cơ trở thành cỏ dại, dịch hại có thể xâm lấn của cây trồng chuyển gen so với cây trồng truyền thống. Trong trường hợp dữ liệu thu được cho thấy không có sự sai khác về các đặc tính đánh giá thì có thể kết luận là cây trồng chuyển gen không làm tăng cường nguy cơ trở thành cỏ dại, dịch hại so với cây trồng truyền thống (OECD, 2008).

Tóm lại, các dòng bông chuyển gen *bar* B9 và BF17 có các đặc điểm nông sinh học (tỷ lệ nảy mầm, sức này mầm, thời gian nở hoa, thời gian nở quả, số quả/cây…) và hình thái (chiều cao cây, dạng thân, màu sắc thân, dạng lá, màu sắc lá, màu sắc hoa…) là hoàn toàn tương tự với đối chứng không chuyển gen Coker310. Mặt khác, các đánh giá về mức độ nhiễm một số bệnh hại chính trên cây bông như bệnh bệnh lở cổ rễ, bệnh mốc trắng và bệnh đốm cháy lá cũng cho thấy tính mẫn cảm với các bệnh này là tương đương nhau giữa các dòng chuyển gen *bar* với đối chứng không chuyển gen. Cho thấy, các dòng chuyển gen B9 và BF17 không thể hiện sự sinh trưởng vượt trội, lấn át so với giống nền Coker310.

Trong nghiên cứu này, 2 dòng chuyển gen *bar* B9 và BF17 đã được tạo ra, Các phân tích PCR và southern blot cho thấy tích hợp thành công gen *bar* vào genome Coker310. Thử tính kháng hygromycin và Glufosinate cũng cho thấy mức độ chống chịu cao với các hóa chất hygromycin B và Glufosinate. Đánh giá thêm các đặc điểm thực vật và nông học trong cả B9, BF17 và giống nền, cho thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể về những đặc điểm này giữa B9, BF17 và giống nền của chúng. Ngoài ra, các nghiên cứu cổ điển như phân tích sự phân ly và tính di truyền đã xác nhận rằng gen *bar* phân ly theo quy luật Mendel cho đơn tính trạng. Phát hiện này phù hợp với Daud và ctv, 2009; Khan và ctv, 2009; Perlak và ctv, 1990; Zhang và ctv, 2005.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1- Dòng Coker310FR chọn lọc qua tái sinh liên tục ba thế hệ của giống bông Coker310 có khả năng tái sinh rất cao, thể hiện qua tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi là 95,6% và tỷ lệ cây tái sinh không dị dạng trên môi trường GR5 là 36,7%.

2- Bốn vector chuyển gen, gồm pCAMBIA1300:*hpt-bar*, pCAMBIA1300:*hpt-EPSPS*, pCB301:*npt*II-*bar* và pCB301:*npt*II-*EPSPS* được tái cấu trúc bằng cách chèn vùng P35S-*EPSPS*-TNOS và PNOS-*bar*-TNOS vào vector biểu hiện thực vật pCB301:*npt*II và pCAMBIA1300:*hpt*. Kiểm tra hiện diện của 04 gen đích và gen độc lực *vir*C khẳng định 04 vector chuyển gen được biến nạp thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260.

3- Nhiễm mẫu thân mầm giống bông Coker310 với *A. tumefaciens* mang gen *EPSPS* và *bar* ở mật độ, thời gian lây nhiễm, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ cảm ứng, sống sót và phát sinh phôi của mô sẹo chuyển gen. Kết quả tốt nhất đạt được khi lây nhiễm vi khuẩn với mật độ OD_{600} 0,75 trong 10 phút, đồng nuôi cấy 64 giờ ở nhiệt độ 22 ^{o}C.

4- Tương tác giữa loại mẫu/giống với tác nhân chọn lọc ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh và tỷ lệ cây mang gen chuyển. Hiệu quả chuyển vector pCAMBIA1300:*bar* vào mẫu lá mầm dòng Coker310FR đạt cao nhất với 2,8% mô sẹo phát sinh phôi, 15,8 cây/mẫu được tái sinh, 76,0% số cây mang gen chuyển và 64,7% trong số đó hữu thụ. Hiệu quả chuyển vector pCB301:*bar* vào mẫu thân mầm dòng Coker310FR đạt cao nhất với 2,1% mô sẹo phát sinh phôi, tái sinh được 20,6 cây/mẫu, 30,2% số cây mang gen chuyển và 82,5% trong số cây đó hữu thụ.

5- Chọn được 5 dòng T_2 chuyển gen *bar* B1, B9, B18 và BF8, BF17 mang 1 bản sao, có hoạt động phiên mã của gen chuyển, cây sinh trưởng đồng đều và chống chịu thuốc trừ cỏ Glufosinate cao (0,6 kg ai./ha).

6- Chọn được 5 dòng T_2 chuyển gen *EPSPS* có 1 bản sao, có hoạt động phiên mã của gen chuyển và chống chịu trung bình với thuốc trừ cỏ Glyphosate là E7, E8, E19, EF14 và EF25, không có dòng chống chịu cao.

7- Hai dòng bông chuyển gen T_2 là B9 và BF17 mang 01 bản sao gen, di truyền gen chuyển theo quy luật Mendel, chống chịu cao với thuốc trừ cỏ Glufosinate ở nồng độ 0,6 kg ai./ha, không sai khác về đặc điểm thực vật học và khả năng chống chịu bệnh hại so với giống bông nền Coker310 không chuyển gen.

2. Đề nghị

1- Sử dụng dòng Coker310FR để chuyển các gen có lợi vào cây bông.

2- Sử dụng 4 vector biểu hiện gen chống chịu thuốc trừ cỏ pCAMBIA1300:*hpt-bar*, pCAMBIA1300:*hpt-EPSPS*, pCB301:*npt*II-*bar* và pCB301:*npt*II-*EPSPS* vào giống bông khác hoặc cây trồng khác để tạo cây trồng có tính chống chịu thuốc trừ cỏ.

3- Áp dụng thông số trong quy trình chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* cho các giống bông.

4- Đánh giá rủi ro ở quy mô sinh thái hạn chế, phát triển 2 dòng B9 và BF17 ở các thế hệ tiếp theo để đủ điều kiện làm vật liệu lai tạo giống tiến tới phổ biến giống.

CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Thị Nhã**, Trịnh Thị Vân Anh, Võ Thị Xuân Trang, Nguyễn Ngọc Uyên Trinh, Phan Hồng Hải, Phạm Bích Ngọc, **Bùi Minh Trí, Phan Thanh Kiếm**, Trịnh Minh Hợp (2016). **Hiệu quả chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ vào cây bông (*G. hirsutum* L.) qua trung gian *A. tumefaciens.*** Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, tháng 8/2016.
2. Trịnh Minh Hợp, **Nguyễn Thị Nhã**, Mai Văn Hào, Trịnh Thị Vân Anh, Võ Thị Xuân Trang, Nguyễn Ngọc Uyên Trinh, Phan Hồng Hải, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn, Phạm Bích Ngọc và Trần Thanh Hùng (2016). **Nghiên cứu tạo giống bông kháng sâu và chống chịu thuốc trừ cỏ bằng kỹ thuật chuyển gen.** Tạp chí công thương/ấn phẩm Khoa học & Công nghệ số tháng 8/2016.
3. **Nguyễn Thị Nhã, Bùi Minh Trí, Phan Thanh Kiếm** (2020)**. Chọn lọc cây bông (*Gossypium hirsutum* L.) chuyển gen *bar* chống chịu thuốc diệt cỏ gốc glufosinate**. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh 19 (5): 71-79.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angenon G., Dillen W. and Van Montagu M., 1994. *Antibiotic resistance markers for plant transformation*. Springer, Dordrecht.
2. Anonymous, 2013. Liberty 280 SL specimen label, <URL:http://www.cdms.net/LDat/ldUA5000.pdf>
3. Arun M., Subramanyam K., Mariashibu T.S., Theboral J., Shivanandhan G., Manickavasagam M. and Ganapathi A., 2015. Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175: 2266–2287.
4. Bajwa K. S., Shahid A. A., Rao A. Q., Bashir A., Aftab A. and Husnain T., 2015. Stable transformation and expression of GhEXPA8 fiber expansin gene to improve fiber length and micronaire value in cotton. *Front Plant Sci.* 6: 838.
5. Baron C., Domke N., Beinhofer M. and Hapfelmeier S., 2001. Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. *J Bacteriol* 183 (23): 6852-61.
6. Bonny S., 2016. Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. *Environ Manage* 57 (1): 31-48.
7. Brookes G. and Barfoot P., 2015. Key global environmental impacts of global GM crop use 1996–2013, <URL:http://www.landesbioscience.com>
8. Brookes G. and Barfoot P., 2018. Global income and production impacts of using crop technology 1996–2017. *GM Crops Food Biotechnol Agric Food Chain* 6 (1): 13–46.
9. Cangelosi G. A., Best E. A., Martinetti G. and Nester E. W., 1991. Genetic analysis of Agrobacterium. *Methods Enzymol* 204: 384-97.
10. CERA, 2015. Biotech crop database,<URL:http://www.cera gmc.org/?action=gm_crop_database>

11. Chaudhary B., Kuma S., Prasad K. V. S. K., Oinam G. S., Burma P. K. and D. P., 2003. Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker310FR). *Plant Cell Rep* 21: 955-960.
12. Cressey D., 2015. Widely used herbicide linked to cancer". *Nature*. doi:10.1038/nature.2015.17181.
13. Donn G. and Köcher H., 2012. *Inhibitors of glutamine synthetase*. Springer Science & Business Media,
14. Duke S. O., 2014. *Biotechnology: Herbicide resistant crops*. 2, Elsevier, 97.14. Elbaidouri M., Chaparro C. and Panaud O., 2013. Use of next generation sequencing (NGS) technologies for the genome-wide detection of transposition. *Methods Mol Biol* 1057: 265-74.
15. Everman W. J., Thomas W. E., Burton J. D., York A. C. and Wilcut J. W., 2009. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in transgenic and nontransgenic cotton, Palmer amaranth (Amaranthus palmeri), and pitted morningglory (Ipomoea lacunosa). *Weed Science* 57 (4): 357-361.
16. FAO, 2018. Cotton area harvested and production quality, <URL:http://faostat.fao.org/site/567/DestopDefault.aspx?PageID=567>
17. Firoozabady E., Deboer D. L., Merlo D. J., Halk E. L., Amerson L. N., Rashka K. E. and Murray E. E., 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Mol Biol* 10 (2): 105-16.
18. Fraiture M. A., Herman P., De Loose M., Debode F. and Roosens N. H., 2017. How can we better detect unauthorized GMOs in food and feed chains? *Trends Biotechnol* 35 (6): 508-517.
19. Frans R., Talbert R., Marx D. and Crowley H., 1986. *Experimental Design and Techniques for Measuring and Analyzing Plant Responses to Weed Control Practices*. 3rd, WSSA, Champaign,

20. Funke T., Han H., Healy-Fried M. L., Fischer M. and Schönbrunn E., 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (35): 13010-13015.
21. Gelvin S., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant physiology* 51: 223-256.
22. Gelvin S. B., 2005. Agricultural biotechnology: gene exchange by design. *Nature* 433 (7026): 583-4.
23. Gould J., Banister S., Hasegawa O., Fahima M. and Smith R. H., 1991. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot apex tissues for transformation. *Plant Cell Rep* 10 (1): 12-6.
24. Green J. M., 2009. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Sci.* 57: 108–117.
25. Green J. M., 2014. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag Sci.* 70 (9): 1351–1357.
26. Green J. M. and Owen M. D., 2011. Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (11): 5819-29.
27. Haas J. H., Moore L. W., Ream W. and Manulis S., 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 2879.
28. Hamilton R. H. and Fall M. Z., 1971. The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* 27 (2): 229-30.
29. Heap I., The international survey of herbicide resistant weeds, April 15, 2010. <URL:http://www.weedscience.com>
30. HRAC and WSSA, 2015. Summary of herbicide mechanism of action according to the herbicide resistance action committee (HRAC) and weed, <URL:http://wssa.net/wp-content/uploads/HerbicideMOAClassification.pdf>

31. Hwang H.-H., Yu M. and Lai E.-M., 2017. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The arabidopsis book* 15: e0186-e0186.
32. Hwang H. H., Wang M. H., Lee Y. L., Tsai Y. L., Li Y. H., Yang F. J., Liao Y. C., Lin S. K. and Lai E. M., 2010. Agrobacterium-produced and exogenous cytokinin-modulated *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Plant Pathol* 11 (5): 677-90.
33. Hwang H. H., Wu J. H., Liu F., Chang, Tzeng and Kado, 2013. Characterization and host range of five tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains and possible application in plant transient transformation assays. *Plant Pathology* 62: 1384–1397.
34. ICAC, 2008. World cotton area projected stable in 2008/2009.
35. ICAC, 2018. Why Yeilds vary among countries.
36. Irby J., Dodds D. M., Reynolds D., Main C., Barber L., Smith K. L. and Stewart A., 2013. Evaluation of GlyTol™ and GlyTol™ + LibertyLink® cotton in the Mid-South. *Journal of Cotton Science* 17: 131-139.
37. Jadhav M. P. and Katageri I. S., 2017. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation in Coker-312 (*Gossypium hirsutum* L.) Using hypocotyls explants. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 62 (12): 2771-2779.
38. James C., 1997. Global status of transgenic crops in 1997, ISAAA, <URL:http://www.isaaa.org>
39. James C., 2013. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013, ISAAA, <URL:http://www.isaaa.org>
40. James C., 2017. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016, ISAAA, <URL:http://www.isaaa.org>
41. James C., 2018. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2017, ISAAA, <URL:http://www.isaaa.org>
42. James C., 2019. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2018, ISAAA, <URL:http://www.isaaa.org>

43. Jin S., Zhang X., liang S., Nie Y., Guo X. and Huang C., 2005. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 (2): 229-237.
44. Jin S., Zhang XL, Liang SG, Nie YC, Guo XP and C H., 2005. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81: 229–237.
45. Kamo K., 2014. Long term, transgene expression in Lilium longiflorum 'Nellie White' grown outdoors and in the greenhouse. *Scientia Horticulturae* 167: 158-163.
46. Khan D., Variath M., Ali S., Jamil M., Khan M., Shafi M. and Shuijin Z., 2009. Genetic transformation of bar gene and its inheritance and segregation behavior in the resultant transgenic cotton germplasm (BR001). *Pakistan Journal of Botany* 41: 2167-2178.
47. Kishore G. M. and Shah D. M., 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem* 57: 627-63.
48. Komori T., Imayama T., Kato N., Ishida Y., Ueki J. and Komari T., 2007. Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology* 145 (4): 1155-1160.
49. Kondo T., Hasegawa H. and M. S., 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep* 19: 989–993.
50. Lê Trần Bình và Lê Thị Muội, 2005. Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi. *Báo cáo tổng hợp kết quả KHCN đề tài tại Hội đồng Khoa học,* 12/2005.
51. Lê trọng Tình, Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Thị Nhã, Thái Thị Lệ Hằng, Nguyễn Thị Tâm, Trịnh Thị Vân Anh, Đặng Trọng Lương, Phạm Xuân Hội và Nguyễn

Duy Phương, 2014. Chọn tạo giống bông biến đổi gen chịu hạn. *Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ tại Hội đồng Khoa học,* 10/2014.

52. Leelavathi S., Sunnichan V.G., Kumria R., Vijaykanth G.P., Bhatnagar R.K. and Reddy V.S., 2004. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*G. hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 22: 465-470.
53. Lemon R., T. , Baughman R., Boman P., Dotray P. and Baumann, 2004. LibertyLink cotton system.
54. Li H., J. L., Luo J., Hemphill J. K., Wang J. T. and H. G. J., 2001. A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 1-5.
55. Liang C., van Dijk J. P., Scholtens I. M., Staats M., Prins T. W., Voorhuijzen M. M., da Silva A. M., Arisi A. C., den Dunnen J. T. and Kok E. J., 2014. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing vip3A by real-time PCR and next-generation sequencing. *Anal Bioanal Chem* 406 (11): 2603-11.
56. Lu J., den Dulk-Ras A., Hooykaas P. J. J. and Glover J. N. M., 2009. *Agrobacterium tumefaciens* VirC2 enhances T-DNA transfer and virulence through its C-terminal ribbon–helix–helix DNA-binding fold. *PNAS June* 106 (24): 9643-9648.
57. Mayavan S., Subramanyam K., Arun M. R. M., Kapil Dev G., Sivanandhan G., Jaganath B., Manickavasag-am M., Selvaraj N. and Ganapathi A., 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in plant seed transformation strategy in sugarcane. *Plant Cell Reports* 32: 1557–1574.
58. Meyers B., Zaltsman A., Lacroix B., Kozlovsky S.V. and Krichevsky A., 2010. Nuclear and plastid genetic en-gineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances* 28: 747–756.

59. Miki B. and McHugh S., 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107 (3): 193-232.
60. Molin W. T., 2017. Glyphosate, a Unique Global Herbicide. J. E. Franz, M. K. Mao, and J. A. Sikorski, ACS Monograph 189, 1997. 653 pp. *Weed Technology* 12 (3): 564-565.
61. Monsanto E. S., 2010. The agronomic benefits of glyphosate in Europe. February 2010.
62. Myers J.P., Antoniou M.N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., Hansen M., Landrigan P.J., Lanphear B.P., Mesnage R., Vandenberg L.N., Saal F.S., Welshons W.V., Benbroo C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15 (19): 13.
63. Nguyễn Thành Luân, 2014. Thiết kế vector chuyển gen mã hóa protein kháng chất diệt cỏ glyphosate. Luận văn thạc sĩ sinh học. Đại học Thái Nguyên.
64. Nguyễn Thị Nhã, Trịnh Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Tâm, Thái Thị Lệ Hằng, Trịnh Minh Hợp, Bùi Minh Trí và Lê Trọng Tình, 2014. Chuyển gen điều khiển chịu hạn DREB2ACA vào cây bông (*G. hirsutum* L.) thông qua *A. tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 13: 3-9.
65. Nguyễn Thị Nhã, Trịnh Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Tâm, Thái Thị Lệ Hằng, Trịnh Minh Hợp, Bùi Minh Trí và Lê Trọng Tình, 2014. Nghiên cứu tái sinh cây bông (*Gossypium hirsutum* L.) thông qua phát sinh phôi soma từ rễ và lá mầm. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn* 9: 23-31.
66. Niapour N., Baghizadeh A., Tohidfar M. and Pourseyedi S., 2013. *Agrobacterium* mediated transformation of fld and gus genes into canola for salinity stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 9: 74–85.
67. Niazian M., Sadat Noori S.A., Galuszka P. and Mortazavian S.M.M., 2017. Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated and in planta transformation methods. *Czech J. Genet. Plant Breed* 53: 133−143.

68. OECD, 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). Organization for economic cooperation and development, Paris, France.
69. Palmer K. and Gleba Y., 2014. *Plant viral vectors*. Springer, Berlin, Heidelberg,
70. Pandey D. K. and Bhupendra C., 2014. Oxidative Stress Responsive SERK1 Gene Directs the progression of somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310). *American Journal of Plant Sciences* 5: 80-102.
71. Park D., Park S.H., Ban Y.W., Kim Y.S., Park. K.C., Kim N.S., Kim J.K. and Choi I.Y., 2017. A bioinformatics approach for identifying transgene insertion sites using whole genome sequencing data. *BMC Biotechnology* 17 (1): 67.
72. Perlak F. J., Deaton R. W., Armstrong T. A., Fuchs R. L., Sims S. R., Greenplate J. T. and Fischhoff D. A., 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8 (10): 939-943.
73. Pollegioni L., Schonbrunn E. and Siehl D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. *Febs j* 278 (16): 2753-66.
74. Pollegioni L., Schonbrunn E. and Siehl D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. *The FEBS Journal* 278 (16): 2753–2766.
75. Rao A. Q., Ali M. A., Khan M. A. U., Bajwa K. S., Iqbal A., Iqbal T., Shahid A. A., Nasir I. A. and Husnain T., 2016. Science behind cotton transformation, <URL:https://www.intechopen.com/books/cotton-research>
76. Rashid M., He G. and Yang G. X., 2014. *Agrobacterium*- mediated tobacco transformation with wheat DREB2 gene. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 51.
77. Retzinger E. J. and Smith M. C., 1997. Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology* 11: 384–393.
78. Salisu I. B., Shahid A. A., Yaqoob A., Ali Q., Bajwa K. S., Rao A. Q. and Husnain T., 2017. Molecular approaches for high throughput detection and

quantification of genetically modified crops: A Review. *Frontiers in plant science* 8: 1670-1670.

79. Sattar M. N., Kvarnheden A., Saeed M. and Briddon R.W., 2013. Cotton leaf curl disease- an emerging threat to cotton production worldwide. *J Gen Virol.* 94: 695–710.
80. Southern E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98 (3): 503-517.
81. Steinrücken H. and Amrhein N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94 (4): 1207-1212.
82. Sumithra S., Katageri I. S. and Vamadevaiah H. M., 2010. Factors influencing regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of Gossypium herbaceaum and *Gossypium hirsutum* cotton genotypes. *Karnataka J. of Agri. Sci.* 23 (2): 222-226.
83. Sunilkumar G. and Rathore K. S., 2001. Transgenic cotton: Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding* 8: 37-52.
84. Tizaoui K. and Kchouk M. E., 2012. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genet Mol Biol.* 35 (3): 640-9.
85. Tohidfar M., Ghareyazie B., Mosavi M., Yazdani Sh. and Golab-chian R., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. *Iranian Journal of Biotechnology* 6: 164–173.
86. Toshihiko K., Yoshimitsu T., Jun U., Norio K., Yuji I. and Yukoh H., 2006. *Binary vectors and super-binary vectors*. 2nd, Humana Press, 15-43.
87. Trần Quốc Dung, Nguyễn Hoàng Lộc và Trần Thị Lệ, 2006. Công nghệ chuyển gen (động vật, thực vật), <URL:http://www.ebook.edu.vn>

88. Trịnh Minh Hợp, 2012. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp chuyển gen để tạo dòng bông (*Gossypium hirsutum* L.) kháng sâu xanh (*Helicoverpa armigera* Hübner). Luận án tiến sĩ nông nghiệp. Học viện Nông nghiệp.
89. Trịnh Minh Hợp, Lê Trọng Tình, Nguyễn Thị Nhã, Trịnh Thị Vân Anh, Trần Thị Hồng, Mai Văn Hào, Võ Thị Xuân Trang, Phan Hồng Hải và Nguyễn Ngọc Uyên Trinh, 2015. Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ tại Hội đồng Khoa học. 8/2015.
90. Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Thị Nhã, Nguyễn Thị Dung, Bùi Thùy Linh, Đặng Minh Tâm và Lê Trần Bình., 2006. Kết quả nghiên cứu tái sinh cây bông thông qua phôi soma. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn,* 12: 43-46.
91. Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Thị Nhã, Trịnh Thị Vân Anh, Đặng Minh Tâm, Lê Trọng Tình, Trần Thanh Hùng, Phan Hữu Tôn và Lê Trần Bình, 2013. Kết quả nghiên cứu chuyển gen Bt kháng sâu xanh vào cây bông (*G. hirsutum* L.) thông qua *A. tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 22.
92. Trolinder N. and Goodin N. J., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* 8: Plant Cell Rep.
93. Umbeck P., Johnson G., Barton K. and Swain W., 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology* 5 (3): 263-266.
94. USDA, 2015. World agricultural production.
95. USDA, Cotton sector at a glance, 2019-02-18. <URL:www.ers.usda.gov>
96. Vergunst A. C., van Lier M. C. M., den Dulk-Ras A., Grosse Stüve T. A., Ouwehand A. and Hooykaas P. J. J., 2005. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 832-837.
97. Trần Thanh Hùng, Lê Trọng Tình, Đặng Minh Tâm, Mai Văn Hào, Trịnh Minh Hợp, Nguyễn Thị Tho, Vũ Trần Lý, Bùi Thị Tình, 2011. Kết quả thực hiện Dự án đầu tư cho nghiên cứu giống bông giai đoạn 2006-2010. *Báo cáo tại Hội*

đồng Khoa học công nghệ Bộ Công Thương, 01/2011 Hà Nội.

98. Waldron C., Murphy E. B., Roberts J. L., Gustafson G. D., Armour S. L. and Malcolm S. K., 1985. Resistance to hygromycin B : A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol Biol* 5 (2): 103-8.
99. Wamiq G., Alam P., Khan Z. and Khan J. A., 2017. Development of an efficient method for regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. HS6. *Indian Journal of Biotechnology* 15: 39-47.
100. Wang Z.-y., Takamizo T., Iglesias V. A., Osusky M., Nagel J., Potrykus I. and Spangenberg G., 1992. Transgenic plants of tall fescue (festuca arundinacea schreb.) Obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio/Technology* 10 (6): 691-696.
101. Wendel, 1992. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland. *American Journal of Botany* 79 (11): 1291–1310.
102. WHO/FAO, 2016. Report of the Joint Committee on Pesticide Residues, <URL:http://www.who.int/foodsafety>
103. Wu J. H., Zhang X. L., Nie Y. C., Jin S. X. and Liang S. G., 2004. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cotton (*G. hirsutum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 40 (8): 371-375.
104. Xu J., Cao J., Cao D., Zhao T., Huang X., Zhang P. and Luan F., 2013. Flanking sequence determination and event-specific detection of genetically modified wheat B73-6-1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45 (5).
105. Yongxue Y., Bao M. and Liu G., 2010. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic callus of Parthenocissus tricuspidata Planch. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 373–380.
106. Zambre M., Terryn N., De Clercq J., De Buck S., Dillen W., Van Montagu M.,Van Der Straeten D. and Angenon G., 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216 (4): 580-6.

107. Zhang B., 2013. Transgenic cotton: from biotransformation methods to agricultural application. *Methods Mol. Biol.* 958: 3–15.
108. Zhang B. H., Feng R., Liu F. and Wang Q., 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42: 9-16.
109. Zhang Y., Yin X., Yang A., Li G. and Zhang J., 2005. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica* 144 (1): 11-22.
110. Zhang Z., Zhao J., Ding L., Zou L., Li Y., Chen G. and Zhang T., 2016. Constitutive expression of a novel antimicrobial protein, Hcm1, confers resistance to both *Verticillium* and *Fusarium* wilts in cotton. *Sci Rep.* 6: 20773.
111. Ziemienowicz A., 2001. Review: plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum* 23 (3): 363-374.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Một số đặc điểm của giống bông Coker310

Loài: Bông Luồi Nguồn gốc: Nhập nội từ Mỹ

STT	Tính trạng	Giai đoạn (ngày)	**Coker310**	
			Biểu hiện	Điểm
1	Hoa: Màu cánh hoa	60-70	Trắng ngà	1
2	Hoa: Mức độ đốm ở cánh hoa	60-70	Không có hoặc ít	1
3	Hoa: Màu sắc phấn hoa	60-70	Trắng ngà	1
4	Hoa: vị trí của đầu nhuỵ so với bao phấn	60-70	Cao hơn	3
5	Cành quả: Chiều dài (cm)	100-110	26,1-47,7	
6	Cây: Kiểu hoa	100-110	Đơn	3
7	Cành quả: Số đốt	100-110	4,7-6,6	
8	Cành quả: Chiều dài trung bình lóng (cm)	100-110	5,6-7,4	
9	Cây: Số đốt tới cành quả thấp nhất	60-70	5,1-5,7	
10	Lá: Mức độ xanh	60-70	Trung bình	5
11	Lá: Hình dạng	60-70	Xẻ thùy nông	1
12a	Lá: Kích cỡ (chiều dài) (cm)	60-70	12-13,4	
12b	Lá: Kích cở (chiều rộng) (cm)	60-70	13,4 -14,9	
13	Lá: Mật độ lông (mặt dưới)	60-70	Không có hoặc rất ít	1
14	Lá: Tuyến mật	60-70	Có	9
15	Thân: Mật độ lông ở nửa trên	60-70	Ít	3
16	Thân cây: Màu sắc	60-70	Xanh nhạt	1
17	Lá bắc: Răng cưa (ở giai đoạn chín xanh)	80-90	Thô	7
18a	Lá bắc: Kích cỡ (chiều dài) (cm)	80-90	3,9-5,2	
18b	Lá bắc: Kích cỡ (chiều rộng) (cm)	80-90	3	
19a	Quả: Kích cỡ (chiều dài) (cm)	100-110	4-4.2	
19b	Quả: Kích cỡ (đường kính) (cm)	100-110	3,8-4,2	
20	Quả: Hình dạng cắt dọc	100-110	Hình trứng	3
21	Quả: Vết rỗ trên bề mặt	80-90	Không có hoặc rất nhỏ	1
22	Quả: Chiều dài cuống (cm)	100-110	2,16-2,31	
23	Quả: Mức độ nhô lên của đỉnh	100-110	Núm nhỏ ngắn	5

24	Cây: Dạng cây	100-110	Hình tháp	2
25	Cây: Tán lá	100-110	Trung bình	5
26	Cây: Chiều cao (cm)	100-110	87,9-120,2	
27	Quả: Thời gian nở (ngày)	100-110	112	
28	Quả: Độ mở	100-110	Trung bình	5
29	Hạt: Lông áo	150	Có	9
30	Hạt: Mật độ lông áo	150	Trung bình	5
31	Hạt: Màu sắc lông áo	150	Trắng	1
32	Hạt: Khối lượng 100 hạt (g)	150	10,6-10,8	
33	Quả: Tỷ lệ xơ (%)	150	37,2-39,6	
34	Xơ: Chiều dài (mm)	150	26,3-28,6	
35	Xơ: Độ bền (G/tex)	150	29,8-31	
36	Xơ: Độ giãn (%)	150	6,0-7,8	
37	Xơ: Chỉ số Micronaire	150	4,5-5	
38	Xơ : Chỉ số độ đồng đều (%)	150	84,9-85,2	
39	Xơ : Màu sắc	150	Trắng	1

Phụ lục 2. Tên, hãng, nước sản xuất của hóa chất chính sử dụng trong đề tài

TT	Tên hóa chất	Hãng/nước sản xuất	TT	Tên hóa chất	Hãng/nước sản xuất
1	NH_4NO_3	Trung Quốc	38	NaCl	Sigma, Mỹ
2	KNO_3	Trung Quốc	39	SDS	Sigma, Mỹ
3	$MgSO_4.7H_2O$	Trung Quốc	40	CTAB	Merck, Đức
4	KH_2PO_4	Trung Quốc	41	D-sorbitol	Merck, Đức
5	$CaCl_2.2H_2O$	Trung Quốc	42	N-lautoyl sarcrosine	Merck, Đức
6	$MnSO_4.4H_2O$	Trung Quốc	43	Sodium acetate	Merck, Đức
7	$ZnSO_4.7H_2O$	Trung Quốc	44	Sodium nitrate	Merck, Đức
8	H_3BO_3	Trung Quốc	45	Sodium citrate	Merck, Đức
9	KI	Trung Quốc	46	Axít maleic	Merck, Đức
10	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Trung Quốc	47	Ethidium bromide	Merck, Đức
11	$CuSO_4.5H_2O$	Trung Quốc	48	NH_4OAc	Merck, Đức
12	$CoCl_2.6H_2O$	Trung Quốc	49	β-mercaptoethanol	Merck, Đức
13	$FeSO_4.7H_2O$	Trung Quốc	50	Sodium metabisulfite	Merck, Đức
14	Na_2EDTA	Trung Quốc	51	Axít boric	Merck, Đức
15	Glucose	Trung Quốc	52	Chloroform	Merck, Đức
16	Sucrose	Trung Quốc	53	Isoamyl alchohol	Merck, Đức
17	Myo-inositol	Merck, Đức	54	Isopropanol	Merck, Đức
18	Thiamin HCl	Merck, Đức	55	Agarose	Bio-Rad, Mỹ
19	Pyridoxine HCl	Merck, Đức	56	Glycine	Sigma, Mỹ
20	Axít nicotinic	Merck, Đức	57	Gotaq® DNA polymerase	Promega, Mỹ
21	L-asparagine	Merck, Đức	58	RNase	Invitrogen,

TT	Tên hóa chất	Hãng/nước sản xuất	TT	Tên hóa chất	Hãng/nước sản xuất
					Mỹ
22	Glutamine	Merck, Đức	59	*Bam*HI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RI, *Spe*I, *Sma*I	Promega, Mỹ
23	Than hoạt tính	Kanto, Nhật Bản	60	dNTPs	Roche, Đức
24	2,4-D	Kanto, Nhật Bản	61	NaOH	Merck, Đức
25	Kinetin	Merck, Đức	62	DNA lamda	Invitrogen, Mỹ
26	Cao nấm men	Merck, Đức	63	HCl	Sigma, Mỹ
27	Tryptone	Merck, Đức	64	Klenow Fragment	Invitrogen, Mỹ
28	Bacto agar	Merck, Đức	65	DNA ladder 100 bp, 500 bp và 1 kb	Invitrogen, Mỹ
29	Cefotaxime	Canada	66	Glycerol	Sigma, Mỹ
30	Kanamycin	Merck, Đức	67	Cồn tuyệt đối	Merck, Đức
31	Kanamycin	Ấn Độ	68	Ni tơ lỏng	Việt Nam
32	Rifamycine	Merck, Đức	69	T4 ligase	Invitrogen, Mỹ
33	Hygromycin B	Merck, Đức	70	Kit GeneJET Gel	Fermentat
34	GA_3	Merck, Đức	71	Extraction	
35	Gelrite	Merck, Đức		*Dig High Prime* DNA	Roche, Đức
36	Tris base	Merck, Đức		*Labeling and Detection*	
37	EDTA	Merck, Đức		*Starter Kit II"*, Cat. Số 11 585 614 910	

Phụ lục 3. Tên, chủng loại, hãng, nước sản xuất của máy móc, thiết bị chính sử dụng trong đề tài

TT	Tên	Chủng loại	Hãng, nước sản xuất
1	Bàn soi UV	LM-20E	UVP, Mỹ
2	Bếp từ	XL-181FL	Gali, Nhật Bản
3	Bể thủy ổn nhiệt	WB 14	Memmert, Đức
4	Bể gia nhiệt	113004-2CP	Cole Parmer, Mỹ
5	Bình đựng nitơ lỏng	Biocanne 20	Thermolyne, Mỹ
6	Bộ điện di: - Bộ nguồn	Powerpac300	Bio-Rad, Mỹ
	- Bể điện di	Sub cell GT 96	Bio-Rad, Mỹ
7	Cân phân tích	CP224S	Satorius, Đức
8	Kính hiển vi	CH30RF200	Olympus, Nhật Bản
9	Kính hiển vi soi nổi	SZ6045TR	Olympus, Nhật Bản
10	Lò vi sóng	NN-S551WF	National, Nhật Bản
11	Máy cất nước	A4000D	Bibby, Anh
12	Máy chụp hình ảnh gel	Geldoc 2000	Bio-Rad, Mỹ
13	Máy đo pH	MP220	Mettler Toledo, Thụy Sỹ
14	Máy đo quang phổ	Genova MK3	Jenway, Anh
15	Nồi hấp tiệt trùng	HV50	Hirayama, Nhật Bản
16	Máy khuấy từ gia nhiệt	CB162	Sturart, Anh

TT	Tên	Chủng loại	Hãng, nước sản xuất
17	Máy khử nước ion	Labostar™3 TWF/UV	SG Water, Đức
18	Máy làm đá	SIM-F124	Sanyo, Nhật Bản
19	Máy lắc dọc	STR8	Stuart, Anh
20	Máy li tâm thường	EBA20	Hettich, Đức
21	Máy ly tâm lạnh	MIKRO22R	Hettich, Đức
22	Máy nuôi lắc ổn nhiệt	SI50	Sturart, Anh
23	Máy PCR	iCycler™ Thermal Cycler 170-8731	Bio-Rad, Mỹ
24	Máy speed-VAC	DNA110-230	Thermosavant, Mỹ
25	Máy vortex	37600 mixer	*B*RNAstead, Mỹ
26	Pipetman	Pipetman® P	Gilson, Pháp
27	Tủ an toàn sinh học	2246301	Labconco, Mỹ
28	Tủ cấy vô trùng	50547	Astec, Anh
29	Tủ cố định màng lai bằng UV	CL1000	UPV, Mỹ
30	Tủ lai	HB1000	UPV, Mỹ
31	Tủ lạnh thường	SRN21H	Sanyo, Nhật Bản
32	Tủ lạnh sâu -20^{0}C	Freezer1000 S/S 2D	Luzzara-RE, Ý
33	Tủ lạnh sâu -70^{0}C	ULT-2090	Revco, Mỹ
34	Tủ nuôi ổn nhiệt	305-1	Banstead, Mỹ
35	Tủ sấy	UM400	Memmert, Đức

Phụ luc 4. Các bước tái sinh cây bông thông qua phôi soma

1- Khử trùng, gieo hạt và tạo nguyên liệu cảm ứng mô sẹo: Hạt bông được đốt lông áo bằng H_2SO_4 đậm đặc, khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút (hạt vừa mới thu hoạch) hoặc 10 + 5 phút (hạt bảo quản 1 năm) hoặc 10 + 10 phút (hạt bảo quản 2 năm), rửa 5 lần và ngâm hạt bằng nước cất khử trùng trong 12 tiếng. Hạt bông sau đó được tách bỏ vỏ cứng và đặt lên môi trường gieo hạt G (1/2MSB_5+ 20g/L sucrose + 2,5 g/L gelrite, pH= 6.0). Hạt bông được nuôi trong tối 2 ngày, sau đó chuyển ra nuôi sáng 5 ngày.

2- Cảm ứng mô sẹo: Thân và lá mầm của cây bông con 7 ngày tuổi được cắt thành đoạn ngắn 5mm hoặc 5x5cm và đặt lên môi trường cảm ứng mô sẹo CI_4 (MSB_5 + 30 g/L glucose + 0,1 mg/L 2,4D + 0,1 mg/L kinetin + 2,5 g/L gelrit, pH= 5,8). Thời gian nuôi trên môi trường này là 3 tuần.

3- Nhân mô sẹo: Sau 3 tuần nuôi trên môi trường CI, mô sẹo được cấy chuyển lên môi trường nhân mô sẹo CP (MSB_5+ 30 g/L glucose + 2,5 g/L gelrit, pH= 5,8).

Thời gian nuôi trên môi trường này là 6 tuần, 3 tuần cấy chuyển một lần lên môi trường tương tự.

4- Cảm ứng phân hoá phôi: Sau 6 tuần trên môi trường nhân mô sẹo, các mô sẹo được cấy chuyển lên môi trường cảm ứng phân hoá phôi EI (MSB_5 + 1,9 g/L KNO_3 + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2,5 g/L gelrit + 1 g/L glutamine + 0,5 g/L asparagine, pH= 5,8). Thời gian nuôi trên môi trường này là 6 tuần, 3 tuần cấy chuyển một lần lên môi trường tương tự.

5- Phát triển phôi: Sau 6 tuần trên môi trường cảm ứng phân hoá phôi, tiền phôi được cấy chuyển lên môi trường phát triển phôi EP (MSB_5+ 1 g/L glutamine + 0,5 g/L asparagine + 30 g/L glucose + 2,5 g/L gelrit, pH= 5,8). Thời gian nuôi trên môi trường này phụ thuộc vào số lượng cây tái sinh, 3 tuần cấy chuyển một lần lên môi trường tương tự.

6- Nảy mầm và tái sinh cây: Sau 6 tuần nuôi trên mô trường EP, phôi chín được cấy chuyển lên môi trường nảy mầm và tái sinh cây GR (MSB_5+ 20 g/L glucose + 3 g/L gelrite, pH= 5,8). Nuôi cho đến khi cây bông được 2-3 lá thật chuyển sang môi trường G (½ MSB_5 + 20 g/L glucose + 6g/L agar, pH=5,8).

7- Khi cây đạt 3-4 lá thật thì trồng vào bầu đất + cát (tỷ lệ 1:1 v/v) hoặc dung dich ½ MSB_5 đã được khử trùng và nuôi 2 tuần trong điều kiện ẩm độ 100%. Từ tuần thứ 3 trở đi, túi nilon được mở ra. Sau 4-6 tuần cây đã cứng cáp thì chuyển cây trồng trong nhà lưới.

Phụ lục 5. Các quy trình sử dụng trong thiết kế và tái cấu trúc gen

5.1. Thành phần phản ứng với các enzym giới hạn:

Thành phần phản ứng	Thể tích (µl)
Nước khử ion vô trùng	6
Buffer Tango (10X)	6
Enzyme giới hạn 1 (10 U/l)	3
Enzyme giới hạn 2 (10 U/l)	3
Template (đoạn gen hoặc plasmid)	32
Tổng thể tích	50

5.2. Thành phần phản ứng với enzym tạo đầu bằng Klenow Fragment:

Thành phần phản ứng	Thể tích (µl)
Nước khử ion vô trùng	13
Dung dịch đệm Taq + KCl (10X)	5
dNTPs	1
Enzyme Klenow Fragment	1
Template (đoạn gen hoặc plasmid)	30
Tổng thể tích	50

5.3. Tinh sạch **DNA** *từ gel agarose bằng Kit GeneJET Gel Extraction (Fermentas)*

Bước 1: Cắt vùng gel chứa đoạn DNA quan tâm trên bản điện di.

Bước 2: Cân đoạn gel vừa cắt được và xác định thể tích đoạn gel này theo quy ước 1mg trọng lượng sẽ tương đương với 1 µl thể tích.

Bước 3: Bổ sung dung dịch Binding buffer theo tỷ lệ 1:1 với khối lượng của gel. Ủ ở 65°C trong máy ủ nhiệt đến khi gel tan hết, trộn đều.

Bước 4: Sau khi gel tan hoàn toàn chuyển hỗn hợp dung dịch lên cột thôi gel, ly tâm cực đại 12.000 v/p trong 1 phút và loại bỏ dịch chảy qua cột.

Bước 5: Bổ sung 700 µl dung dịch Washing buffer. Ly tâm 12.000 v/p trong 1 phút.

Bước 6: Đổ dịch chảy qua cột đem đi ly tâm khô 12.000 v/p. Chuyển cột sang ống Eppendorf bổ sung 30 – 50 µl nước deion 65°C.

Bước 7: Để trong 2-3 phút sau đó đem ly tâm 12.000 v/p trong 1 phút thu dịch DNA, sau đó chạy điện di để kiểm tra kết quả.

5.4. Phản ứng nối ghép gen nhờ enzyme T_4 ligase

Thành phần phản ứng	Thể tích (µl)
1. H_2O	2,8
2. Buffer T_4 ligase	1,2
3. Vector	1
4. Đoạn gen nối	6
5. T_4 ligase	1
Tổng thể tích	12

5.5. Biến nạp vector vào tế bào khả biến theo phương pháp sốc nhiệt

Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α được tiến hành theo Cohen và cộng sự (1972).

*** Chuẩn bị tế bào khả biến**

Chủng khuẩn được cấy ria trên môi trường LB đặc và nuôi qua đêm ở 37°C, sau đó lấy một khuẩn lạc đơn, to điển hình cấy vào 3ml môi trường LB lỏng, lắc 200 v/p ở 37°C qua đêm. Chuyển 0,5 ml dịch khuẩn sang 50 ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 v/p, 37°C khoảng 3 giờ cho đến khi OD_{660nm} đạt từ 0,6-0,8 thì chuyển dịch nuôi cấy sang ống ly tâm đã giữ lạnh trên đá và ly tâm 6000 v/p, 10 phút. Thu cặn và hòa nhẹ nhàng trong 0,7 – 1,5 ml $CaCl_2$ 0,1M. Chia vào mỗi ống eppendorf 50 µl glycerol 60%, làm đông nhanh bằng nitơ lỏng và giữ ở 80°C. Sau đó, các tế bào được phục hồi trong môi trường nuôi cấy và các tế bào được phát hiện trên môi trường thích hợp. Cấy trải trên đĩa môi trường LB không có kháng sinh để kiểm tra.

*** Biến nạp DNA plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* bằng sốc nhiệt**

Lấy tế bào khả biến *E.coli* ở tủ -84°C bỏ nhanh vào đá trong 30 phút cho tan dần. Sau đó bổ sung 5 µl DNA plasmid vào ống đựng tế bào khả biến và trộn đều sau đó giữ trong đá 30 phút. Đem sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây rồi chuyển ngay sang đá giữ trong đá 5 phút. Bổ sung 0,5 ml môi trường SOC, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C trong 1 giờ. Cấy trải dịch tế bào lên trên đĩa LB đặc có bổ sung kháng sinh thích hợp và nuôi qua đêm ở 37°C.

5.6. Phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony-PCR) chọn lọc dòng tế bào vi khuẩn mang vector tái tổ hợp

Nguyên tắc kỹ thuật colony_PCR cũng dựa trên nguyên tắc của kỹ thuật PCR chỉ khác là mẫu DNA được thay thế bằng plasmid được giải phóng từ khuẩn lạc. Ở nhiệt độ 94°C đến 95°C, màng tế bào vi khuẩn bị phá vỡ, giải phóng plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp sẽ làm khuôn cho phản ứng PCR nhân gen bằng cặp mồi đặc hiệu, hoặc mồi vector.

- Pha các colony đơn trong 5 µl nước, đun sôi khoảng 3 phút.

- Thêm các thành phần phản ứng PCR đã được tính toán cho một phản ứng PCR 10µl.

H_2O	1,8µl
Taq buffer	1µl
dNTPs	1µl
Mồi xuôi (10ng/µl)	0,5µl
Mồi ngược (10ng/µl)	0,5µl
Taq Polymerase	0,2µl

5.7. Tách chiết plasmid từ tế bào E.coli

1) Cấy chuyển 1 khuẩn lạc vào ống penicilin chứa 2ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 vòng/ phút qua đêm ở 37°C.
2) Chuyển 1,5 ml dịch nuôi cấy vào eppendorf, ly tâm 10000 vòng/ phút trong 1 phút, loại dịch trên.
3) Bổ sung 200 µl dung dịch Sol I (Tris HCl 50Mm, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0), dùng máy Voltex hòa tan tế bào. Từ bước này các thao tác phải được thực hiện trong đá.
4) Bổ sung 200 µl dung dịch Sol II (200mM NaOH + SDS 1%), đảo nhẹ nhàng. Dung dịch sol II có tác dụng phá vỡ thành tế bào.
5) Bổ sung 150 µl dung dịch Sol III (Kali Acetat 3M, pH 5,5) để kết tủa protein, đảo đều.
6) Bổ sung 500 µl Chloroform : isoamin (24:1), lắc đều.
7) Ly tâm 13000 vòng/ phút trong 10 phút. Dưới tác dụng của lực ly tâm, mẫu chia thành ba pha: pha trên chứa DNA plasmid, pha giữa là protein tủa và pha dưới cùng là tạp chất.
8) Dùng pipet hút nhẹ nhàng pha trên cùng chứa DNA plasmid sang ống eppendorf mới.
9) Bổ sung 1ml ethanol 100% để tủa plasmid, đặt mẫu tủa ở tủ - 20°C trong 30 phút.
10) Ly tâm thu DNA plasmid ở 13000 vòng/ phút trong 10 phút.
11) Làm khô mẫu trong box cấy trong 15 phút. Hòa tan DNA thu được trong 30 µl H_2O
12) Điện di kiểm ta plasmid trên gel agarose 0,8%.

5.8. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến A. tumefaciens C58/PGV2260 bằng xung điện

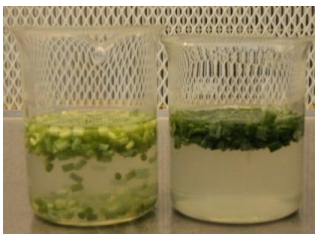
*** Chuẩn bị tế bào khả biến *A.tumefaciens* C58/PGV2260**

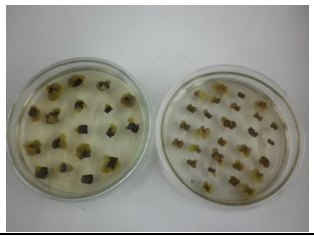
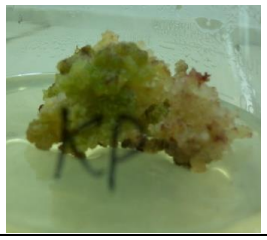
Lấy 50 ml tế bào vi khuẩn *A.tumefaciens* C58/PGV2260 nuôi cấy trên môi trường mới đến đầu pha log được thu lại bằng ly tâm lạnh. Cặn của tế bào vi khuẩn được làm sạch bằng cách rửa nhiều lần bằng nước khử ion và glyxerol 10% đã được làm lạnh trước. Các thao tác được thực hiện trong bốc vô trùng. Bước cuối cùng bổ sung 0,5 ml glycerol 10% chia đều 50 µl vào 10 ống eppendorf và giữ ở tủ -85°C.

*** Phương pháp biến nạp bằng xung điện**

- Chuẩn bị tế bào khả biến trong các cuvet đã khử trùng.
- Đặt các ống cuvet đã khử trùng vào đá.
- Bổ sung 5 µl plasmid tái tổ hợp vào 100 µl đựng sẵn tế bào *A.tumefaciens* khả biến.
- Đảo nhẹ, đặt trong đá 5 phút, chuyển dịch sang ống cuvet mới.
- Xung điện 2,5 kw; 25 µF và 400 Ω trong 4 – 5 µl.
- Chuyển ngay ống dịch vào đá, sau 5 phút, bổ sung 1ml môi trường LB, mix nhẹ và chuyển các tế bào sang ống eppendorf 2ml, nuôi lắc ở 28°C trong 1 giờ.
- Cấy trải 100 µl tế bào vào đĩa chứa môi trường kháng sinh chọn lọc và nuôi từ 24 – 48 giờ.

Phụ luc 6. Các bước chuyển gen vào cây bông qua trung gian *A. tumefaciens*

Bước	Công việc	Môi trường	Điều kiện	Hình minh họa
1	**Chuẩn bị mẫu** (1 tuần trước khi biến nạp)	G	2 ngày nuôi tối 4-5 ngày nuôi sáng	
2	**Chuẩn bị vi khuẩn**	LB + Ka. + Ri.	Nuôi lỏng: lắc 220 vòng/phút ở 28^{0}C và qua đêm	
3	**Biến nạp** - Mẫu thân: pCB - Mẫu lá: pCAM	CI	- OD_{600} (theo thí nghiệm) - Nhiễm (theo thí nghiệm) - Đồng nuôi (theo thí nghiệm)	

Bước	Công việc	Môi trường	Điều kiện	Hình minh họa
4	**Cảm ứng mô sẹo chuyển gen**	CI + 75 mg/L Ka. (pCB) hoặc 10 mg/L Hy. (pCAM) 500 mg/L Ce.	4 tuần	
5	**Chọn lọc mô sẹo chuyển gen**	CP + 75 mg/L Ka. (pCB) hoặc 10 mg/L Hy. (pCAM) 300 mg/L Ce.	7-12 tuần, 3 tuần cấy chuyển 1 lần	
6	**Cảm ứng phân hóa phôi**	EI + 75 mg/L Ka. (pCB) hoặc 0 mg/L Hy. (pCAM) 300 mg/L Ce.	Nuôi 6-8 tuần, 3-4 tuần cấy chuyển 1 lần	
7	**Phát triển phôi**	EP: CP + 1 g/L glutamine + 0,5 g/L asparagine	2-3 tuần cấy chuyển 1 lần, số lần cấy 13-15 lần	
8	**Tạo cây hoàn chỉnh**	GR	3-5 tuần	
9	**Huấn luyện cây chuyển gen trong phòng**	Giá thể cát, tưới bằng dung dịch 1/2 MS	3-5 tuần	

Bước	Công việc	Môi trường	Điều kiện	Hình minh họa
10	**Huấn luyện cây chuyển gen ngoài phòng**	Giá thể cát, tưới bằng dung dịch 1/2 MS	2-3 tuần	
11	**Trồng cây trong nhà lưới, chọn lọc cây chuyển gen**	Đất, tưới nước và phân bón		

6.2. Phương pháp tiến hành

6.2.1. Vật liệu

- Giống bông: Coker310, Coker310FR, trong đó Coker310 có khả năng tái sinh thông qua tạo phôi soma và đang được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* trên thế giới. Dòng Coker310FR có khả năng tái sinh hoàn toàn, chọn lọc từ cây Coker310 tái sinh qua phôi soma (Nội dung 1.1), sau đó, tiến hành tự thụ và kiểm tra khả năng tái sinh ít nhất 3 thế hệ.

- Gen chuyển: pCB301:*EPSPS và* pCB301:*bar* mang gen chọn lọc *npt*II kháng kanamycin; pCAMBIA1300:*EPSPS* và pCAMBIA1300:*bar* mang gen chọn lọc *hpt* kháng hygromycin.

- Hóa chất: Muối MS, Gelrite, Glutamine, L-asparagine, Tryptone, Bacto agar, Cao nấm men, Cefotaxime, Kanamycin, Hygromycin, Rifamycine, 2,4-D, Kinetin, Glucose …

+ Thành phần và nồng độ các hoá chất trong môi trường muối MS và vitamin B_5 (MSB_5)

Thành phần	Hoá chất	Nồng độ (mg/L môi trường)
	KNO_3	1.900,000
	NH_4NO_3	1.650,000
	$MgSO_4.7H_2O$	370,000
	KH_2PO_4	170,000
	$CaCl_2$	332,020
	H_3PO_3	6,200

	$MnSO_4.4H_2O$	22,300
	$MnSO_4.H_2O$	16,900
Muối MS	$ZnSO_4.7H_2O$	8,600
	KI	0,830
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,250
	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
	$Na_2EDTA.2H_2O$	37,250
	$FeSO_4.7H_2O$	27,850
	Myo-inositol	100,000
Vitamin B_5	Axít nicotinic	1,000
	Pyridoxine HCl	1,000
	Thiamin HCl	10,000

+ Môi trường LB lỏng: 10 g/L NaCl + 5g/L Cao nấm men + 10 g/L Tryptone, pH 7,0

+ Môi trường LB đặc: LB lỏng + Bacto Agar 16 g/L

6.2.2. Các bước thực hiện

Bước 1: Chuẩn bị mẫu

- Hạt bông được đốt lông áo bằng H_2SO_4 đậm đặc, khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút, bằng $HgCl_2$ trong 15 phút và lặp lại trong 5 phút. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng, thấm khô hạt, tách bỏ vỏ cứng và đặt lên môi trường gieo hạt G (1/2 MSB_5+ 20 g/L sucrose + 2,5 g/L gelrite, pH= 6.0).

- Nuôi tối 2-3 ngày, sau đó chuyển ra điều kiện 16/8h chiếu sáng/tối, nhiệt độ nuôi cấy $26^0C\pm2$, cường độ ánh sáng 2000 lux, nuôi trong 5-7 ngày.

- Thu hoạch cây con, lấy thân mầm cắt thành các đoạn dài 4-5 mm hoặc lá mầm cắt thành mảnh kích thước 4 x 4 mm để sử dụng làm mẫu cho thí nghiệm.

Bước 2: Chuẩn bị vi khuẩn

- Trước khi biến nạp, lấy 1 khuẩn lạc cho vào nuôi lắc trong 50 ml dịch nuôi khuẩn bổ sung kháng sinh 50 mg/L kanamycin và 50 mg/L rifamycin, nuôi lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 28 ^oC trong 2 ngày.

- Ly tâm dịch để thu sinh khối tế bào, rửa sạch sinh khối tế bào khỏi dung dịch nuôi khuẩn bằng dung dịch CI lỏng. Hòa tan cặn khuẩn để tạo dịch huyền phù bằng dung dịch CI lỏng, đo OD_{600} đến giá trị xác định tại thí nghiệm mật độ vi khuẩn trong

mục 2.2.1.3.

Bước 3: Biến nạp và đồng nuôi cấy

- Ngâm mẫu trong dịch vi khuẩn trong thời gian xác định tại thí nghiệm thời gian lây nhiễm ở mục 2.2.1.3, sau đó thấm khô trên giấy thấm mềm và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy CI, gồm MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 0.1 mg/L 2.4-D + 0.1 mg/L kinetin, pH 5.8.

- Đồng nuôi cấy ở khoảng thời gian và nhiệt độ đã xác định tại thí nghiệm trong mục 2.2.1.3.

Bước 4: Cảm ứng mô sẹo và đánh giá mô sẹo chuyển gen

Sau khi đồng nuôi cấy 2 ngày, chuyển các mẫu biến nạp lên môi trường cảm ứng mô sẹo chuyển gen CIK: MS khoáng + B5 vitamin + 30g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 0.1 mg/L 2.4-D + 0.1 mg/L kinetine, pH5.8, bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAMBIA1300) và 500 mg/L cefotaxime ức chế *A. tumefaciens*. Cảm ứng trong 6-8 tuần.

Bước 5: Chọn lọc mô sẹo chuyển gen

- Lần 1: Những mô sẹo cảm ứng được chuyển lên môi trường chọn lọc mô sẹo chuyển gen CPK: MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, có bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAMBIA1300) và 300mg/L cefotaxime. Thời gian nuôi 3-4 tuần.

- Lần 2: Chuyển những mô sẹo sống sót lên môi trường trường chọn lọc mô sẹo chuyển gen CPK: MS khoáng + B5 vitamin + 30 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, 75 mg/L kanamycin (pCB301) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAMBIA1300) và 300mg/L cefotaxime. Thời gian nuôi 6-8 tuần (lượng môi trường tăng gấp đôi: 100ml/bình).

Bước 6: Cảm ứng phát sinh phôi

Những mô sẹo sống sót được chuyển lên môi trường cảm ứng phân hóa phôi (100ml/bình) EIK: MS khoáng (không có NH_4NO_3, tăng gấp đôi lượng KNO_3 (1,9 g/L)) + B5 vitamin + 30g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8, bổ sung 75mg/L kanamycin (pCB) hoặc 10 mg/L hgromycin (pCAM) và 200 mg/L cefotaxime. Thời

gian nuôi cấy phụ thuộc vào sự phát sinh phôi của mô sẹo, 6-8 tuần cấy chuyển 1 lần.

Bước 7: Phát triển phôi chuyển gen

- Khi mô sẹo phát sinh phôi chuyển lên môi trường phát triển phôi: MS khoáng + B5 vitamin + 20 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite + 1g/L glutamine + 0.5 g/L asparagine, pH5.8. 2-3 tuần cấy chuyển phôi lên môi trường tương tự, cấy chuyển 13-15 lần.

- Trong quá trình cấy chuyển, tách riêng những phôi trưởng thành (Phôi bông trưởng thành có kết cấu rời rạc, hình quả thủy lôi và thường có màu vàng xanh hoặc vàng) đặt lên môi trường nảy mầm và tái sinh cây GR5: ½ MS khoáng + ½ B5 vitamin + 20 g/L glucose + 2.5 g/L gelrite, pH5.8.

Bước 8: Tạo cây hoàn chỉnh

Những phôi nảy mầm được tách riêng đặt lên môi trường tạo cây hoàn chỉnh GR (½ MSB_5 + 20 g/L glucose + 6g/L agar, pH=5,8). Nuôi cho đến khi cây có 4-6 lá, có bộ rễ phát triển.

Bước 9: Huấn luyện cây tái sinh

Khi cây đạt 4-6 lá thật, mang bình ra ngoài cho quen với môi trường 1-2 ngày, thu cây, rửa sạch agar và trồng vào bầu đất + cát (tỷ lệ 1:1 v/v) hoặc dung dịch ½ MSB_5 đã được khử trùng, nuôi 2 tuần trong điều kiện ẩm độ 100%. Từ tuần thứ 3 trở đi, túi nilon được mở ngắt quãng trong ngày.

Sau 4-6 tuần cây đã cứng cáp, mở túi và chuyển bầu ra khỏi phòng, khu vực để bầu cần được bao kín bằng màng polyetylen trong để giữ ẩm độ mà vẫn có đủ ánh sáng.

Bước 10: Trồng cây tái sinh ra chậu

Khi cây trong bầu cứng cáp, tiến hành trồng vào chậu hoặc trồng thẳng ra đất trong nhà lưới, chăm sóc, phòng trừ sâu bệnh hại như với cây gieo từ hạt.

Bước 11: Trồng cây tái sinh ra đất

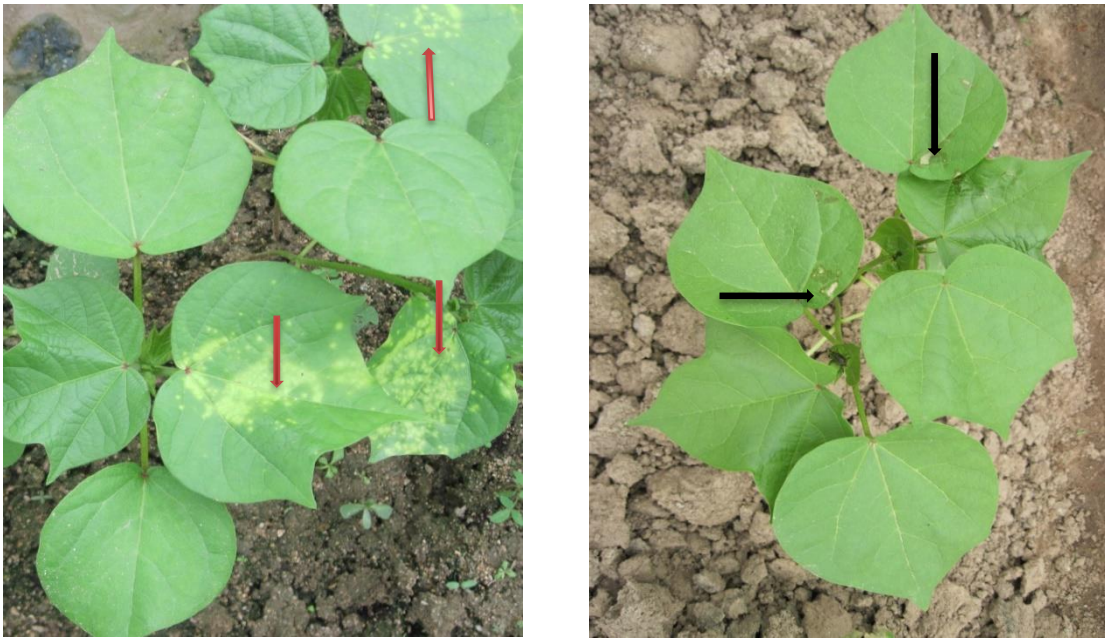
Khi cây trong bầu cứng cáp, tiến hành trồng vào chậu hoặc trồng thẳng ra đất trong nhà lưới, chăm sóc, phòng trừ sâu bệnh hại như với cây gieo từ hạt.

Bước 12: Đánh giá và chọn lọc cây chuyển gen

a) Sàng lọc cây chuyển gen bằng kháng sinh

- Sàng lọc cây chuyển gen bằng hygromycin: khi cây tái sinh từ phương pháp chuyển gen vi khuẩn, cây chuyển gen thế hệ T_1, T_2 trong nhà lưới có 2-3 lá thật, phết dung dịch hygromycin nồng độ 1.000 mg/L lên mặt trên lá hơi xòe. Theo dõi tính mẫn cảm trên lá đã phết hygromycin.

- Sàng lọc cây chuyển gen bằng kanamycin: khi cây tái sinh từ phương pháp chuyển gen vi khuẩn, cây chuyển gen T_0 của giống COKER310 trong nhà lưới, trồng cây tái sinh từ phương pháp chuyển gen vi khuẩn, gieo hạt chuyển gen thế hệ T_1, T_2. Khi cây có 2-3 lá thật, phết dung dịch kanamycin nồng độ 4.000 mg/L lên cây. Theo dõi tính mẫn cảm trên lá đã phết kanamycin.



A B

Hình phụ lục 6: Cây Coker310 mẫn cảm với Ka. (A) và mẫm cảm với Hy. (B)

Phụ lục 7. Quy trình tách chiết và tinh sạch DNA tổng số từ lá bông non

7.1. Hóa chất, dung dịch tách chiết

7.1.1. Đệm rửa (WB)

TT	Dung dịch gốc	Nồng độ	Thể tích 10 ml
1	Tris HCl 1 M, pH= 8	100 mM	1 ml
2	EDTA 0,5 M, pH= 8	5 mM	100 µl
3	Sorbitol 2 M	0,35 M	1,75 ml

4	Sodium bisulfite (NaH_2PO_4)	0,4 g/100 ml (0,4%)	0,04 g
5	H_2O	-	

7.1.2. Đệm chiết (EB)

TT	Dung dịch mẹ	Nồng độ	Thể tích 10 ml
1	Tris HCl 1 M, pH= 8	200 mM	2 ml
2	EDTA 0,5 M, pH= 8	50 mM	1 ml
3	CTAB	2%	0,2 g
4	NaCl 5 M	2 M	4 ml
5	H_2O	-	

7.1.3. Các dung dịch: Chloroform : isomyl alcohol (CIA 24 : 1), isopropanol lạnh (-20^0C) và ethanol 70%.

7.2. Các bước thực hiện

1) Lấy khoảng 100-200 mg lá vào eppendorf 2 ml.

2) Đổ nitơ lỏng vào ống và nghiền đến khi thật mịn, thao tác nhanh. Lưu ý, với mẫu cây nuôi cấy *in vitro* trong ống nghiệm, bỏ qua giai đoạn rửa; với mẫu thu ngoài đồng ruộng, tiến hành rửa qua đệm rửa):

- Bổ sung 0,8 ml đệm rửa, vortex trong 40 giây.
- Ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi (lặp lại 2-3 lần).

4) Bổ sung 650 µl đệm chiết vào epepndorf chứa mẫu nghiền. Đảo đều ống (20-40 lần), giữ ở 65 ^{o}C trong 30 phút cứ 10 phút lấy ra đảo đều một lần.

5) Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

6) Bổ sung 650 µl chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1).

7) Đảo trong 10 phút để trộn đều dung dịch.

8) Ly tâm mẫu với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

9) Dùng pipet chuyển dịch nổi sang ống mới.

10) Bổ sung 1 : 1 v/v isopropanol (lạnh) vào eppendorf và đảo đều, để lên đá.

11) Nếu có DNA nổi thì vớt sang ống eppendorf khác, nếu không có thì ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cặn.

12) Rửa DNA bằng 350-400 µl ethanol 70% 2 lần. Mỗi lần rửa, ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 2 phút sau đó nhẹ nhàng loại bỏ ethanol (tránh để DNA rơi ra ngoài).

13) Làm khô DNA bằng quạt gió hoặc máy hút chân không.

14) Hòa tan DNA trong 100-200 µl TE có bổ sung 5 µl RNase (10 mg/ml). Giữ ở nhiệt độ 37 ^{o}C trong 1-2 giờ hoặc có thể để qua đêm ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra DNA bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

***7.3. Tinh sạch và thu thập* DNA** (dùng cho Southern blot)

1) Bổ sung 200 µl hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) (trước khi sử dụng phải lắc đều hỗn hợp). Sau đó lắc mạnh hỗn hợp để trộn đều các sản phẩm. Ly tâm với tốc độ 10.000-13.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 ^{o}C (thấy xuất hiện hai lớp, phần dịch nổi bên trên có chứa DNA).

2) Chuyển phần dịch nổi (pha trên) sang ống eppendorf mới và bổ sung 20 µl sodium acetate 3 M, cho tiếp 450 µl ethanol lạnh (100%) vào đảo nhẹ.

3) Giữ sản phẩm ở - 20 ^{o}C trong 30 phút.

4) Ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 15 phút.

5) Rửa DNA bằng 150-200 µl ethanol 70% hai lần. Sau mỗi lần rửa, ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 2 phút, sau đó nhẹ nhàng loại bỏ ethanol

6) Bổ sung 50 µl TE vào sản phẩm và giữ trong tủ lạnh 4 ^{o}C qua đêm sau đó bảo quản trong tủ lạnh - 20 ^{o}C.

7) Điện di kiểm tra chất lượng DNA tổng số và đo nồng độ bằng máy OD.

Phụ lục 8. Quy trình PCR nhân gen *hpt, npt*II, *EPSPS, bar* và *vir*C

1) Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR loại iCycler™ Thermal Cycler 170-8731, với thể tích phản ứng 25 µl, trong đó chứa các thành phần phản ứng là H_2O, 1X PCR buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs, 25 pM mồi/1 mồi, 10 ng DNA tổng số và 1 U Taq DNA polymerase.

2) Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR nhân gen:

Bước 1: 95 ^{o}C trong 2 phút,

Bước 2: 95 ^{o}C trong 1 phút 30 giây,

Bước 3: 58 ^{o}C trong 45 giây (*hpt*), 62 ^{o}C trong 45 giây (*nptII*), 55 ^{o}C trong 60 giây (*EPSPS, bar*)

Bước 4: 72 ^{o}C trong 1 phút (*bar*) 1 phút 30 giây (*hpt, nptII, EPSPS*)

Bước 5: 72 ^{o}C trong 8 phút,

Bước 6: giữ lạnh ở 4 ^{o}C,

Lặp lại từ bước 2 đến bước 4: 35 chu kỳ.

3) Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,2% ở 60 V trong 45 phút. Nhuộm gel trong ethidium bromide 0,5 µg/ml trong 15 phút và soi dưới đèn UV, chụp ảnh và xác định kết quả.

Phụ lục 9. Quy trình Southern blot

9.1. Chuẩn bị dụng cụ

- Thiết bị điện di.
- 0,8% agarose gel, đệm điện di
- Thước kẻ, bút chì mềm, kéo
- Giấy thấm
- Hộp nhựa có nắp chặt
- Hộp đáy nông 28 x 51 cm
- Cốc đong 500 ml
- Ống lai
- Tấm kính hoặc nhựa (20 x 30 cm).
- Bể nước ổn nhiệt
- Thiết bị chụp gel

9.2. Chuẩn bị các dung dịch

1) 20X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M trisodium citrate, pH= 7,0. Cân 175,3 g NaCl và 88,2 g sodium citrate cho vào 800 ml nước, chỉnh pH tới 7,0 bằng NaOH 10 N, thêm nước cho đủ 1 lít, hòa tan và hấp vô trùng (pha 2 lít/lần).

2) 10% SDS: Hòa tan 2 g SDS trong 18 ml nước, làm nóng đến 68^{0}C để hỗ trợ việc hòa tan, chỉnh pH đến 7,2 bằng HCl. Thêm nước cho đủ 20 ml.

3) 5 M NaCl

4) 10N NaOH

5) Maleic acid: 0.1M Maleic acid, 0.1M NaCl, pH 7,5

6) Dung dịch biến tính: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

7) Dung dịch trung hòa: 3,0 M NaCl, 0,5 M tris-HCl, pH= 8

8) Dung dịch tiền lai: Dig Easy Hyb, pha theo hướng dẫn của kít

9) Dung dịch lai: Dung dịch tiền lai + mẫu dò.

10) Dung dịch rửa I: 2x SSC, 0,1% SDS

11) Dung dịch rửa II: 0,5x SSC, 0,1% SDS

12) Dung dịch rửa III: Dung dịch Maleic acid, 0,3% Tween 20

13) Dung dịch dò tìm : 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl; pH 9.5.

9.3. Blotting

1) Cắt DNA genome bông

- Cắt 30 µg DNA tổng số của các dòng bông chuyển gen bằng enzym *PstI (bar), HindIII (EPSPS)*: Cắt qua đêm ở 37 ^{0}C, thành phần phản ứng cắt bao gồm 1X RE buffer, RE, DNA template và H_2O trong 50 µl.

- Điện di trên 0,8% gel agarose ở 1V/cm gel cho đến khi dye chạy được 3/4 bản gel trong khoảng 20h. Điện di cùng với 1 µg 1 kb ladder.

- Nhuộm và chụp ảnh (để thước kẻ bên cạnh maker để đánh dấu vị trí các băng).

2) Chuẩn bị gel để chuyển DNA

- Cho vào dung dịch biến tính (2-3 lần thể tích gel) trong 30 phút đến 2 giờ ở nhiệt độ phòng, có lắc nhẹ. Lặp lại 1 lần trong 20 phút.

- Loại bỏ dung dịch biến tính và rửa gel bằng nước cất vô trùng.

- Ngâm gel trong dung dịch trung hòa (2-3 lần thể tích gel) > 30 phút ở nhiệt độ phòng, có lắc nhẹ. Giữ gel trong đệm này đến khi chuyển sang bể thấm chuyển.

3) Chuyển DNA lên màng

- Cắt màng nilon thành miếng cho phù hợp với kích thước của gel, ngâm màng trong nước cất vô trùng sau đó là đệm chuyển (cho lượng vừa đủ dìm ngập ướt màng hoàn toàn) và giữ nguyên cho đến khi cho vào bể thấm chuyển.

- Chú ý, màng nilon rất dễ bị hỏng, cần đeo găng tay và luôn cầm ở góc để tránh chầy xước và bị uốn cong. Sử dụng bút chì viết những thông tin cần thiết lên phần rìa chỗ

tiếp xúc với gel.

- Cắt 2 miếng giấy Whatman 3MM cùng kích thước với gel và ngâm trong đệm chuyển (giấy được thấm ướt đều nhưng không để bọt khí xuất hiện).
- Đặt miếng xốp dày 4-6 cm hoặc lật úp khay đổ gel vào trong khay nhựa và đổ ngập đệm chuyển (20X SSC).
- Phủ giấy bóng kính lên xốp (nếu là khay đổ gel thì không cần), phủ cầu giấy lên.
- Lấy gel ra khỏi dung dịch trung hòa, đặt úp gel lên trên giấy Whatman 3MM, kiểm tra không cho bọt khí xuất hiện, loại bỏ bọt bằng pipet. Cắt 1 miếng nhỏ phía góc cuối gel và ghi lại góc đã cắt liên quan tới các vị trí của DNA trên gel.
- Cẩn thận đặt màng nylon lên trên gel (màng đã được làm ẩm trong 20X SSC, đặt úp mặt đã ghi chú), chắc chắn không có sự xuất hiện của bọt khí. Cắt góc của màng và đảm bảo các lane DNA được phủ hoàn toàn.
- Ngáng parafilm hoặc giấy bóng kính xung quanh gel để che phần dư của giấy Whatman 3MM, che luôn cả những chỗ gel hở, đảm bảo chỉ có một đường dẫn chuyển từ gel lên màng.
- Đặt 2 miếng giấy Whatman 3MM đã ngâm trước đó (cùng kích thước với gel) lên màng.
- Để vài giây cho khô miếng giấy trên cùng. Đặt tháp giấy thấm khô dày 16-20 cm lên trên.
- Để 1 miếng kính hay nắp nhựa lên trên tháp giấy.
- Đặt vật nặng thích hợp (tương đương 500 g) lên trên cùng.
- Blotting từ 18 - 24 giờ ở nhiệt độ phòng.
- Tháo dỡ màng: Đeo găng tay, cẩn thận loại bỏ từng phần trên gel, dùng bút chì mềm chọc thủng các giếng để đánh dấu vị trí các giếng trên màng. Bóc gel và giấy Whatman 3MM ra khỏi màng, dùng kẹp đặt màng lên miếng giấy Whatman 3MM khác (đã ngâm trong 2X SSC) sau đó phủ 1 miếng nữa lên trên.
- Lấy màng ra, rửa trong 2X SSC, sau cố định DNA bằng cách nướng ở 120^0C trong 30 phút hoặc UV Crosslink màng trên máy UV trong 3 phút/mặt.
- Sử dụng ngay hoặc cất trong túi nilon để trữ trong ngăn mát tủ lạnh.

9.4. Đánh dấu mẫu dò (theo kít *"Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II"*, Cat. số: 11 585 614 910 của Hãng Roche).

Quy trình này được thiết kế cho từ 10 ng - 3 µg DNA. Với số lượng lớn hơn (khoảng 10µg) có thể thực hiện bằng cách tăng nồng độ các thành phần và thể tích.

CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Bước 1: Cho 1 µg sản phẩm PCR nhân gen đoạn cần đánh dấu vào nước sao cho tổng thể tích cuối cùng là 16 µl trong ống phản ứng.

Bước 2: Biến tính DNA bằng cách gia nhiệt trong nước sôi trong vòng 10 phút, sau đó để ngay lên đá. **Chú ý:** Công đoạn biến tính là rất quan trọng tới kết quả đánh dấu DNA

Bước 3: Mix kỹ DIG-High Prime (ống 1), lấy 4 µl bổ sung vào DNA đã biến tính ở bước 2, Mix kỹ và spin. Sau đó, ủ trong vòng 1 giờ hoặc qua đêm ở 37 ^{o}C. Chú ý: Nếu thời gian ủ lâu hơn (đến 20 giờ) sẽ làm tăng sản phẩm các đầu dò (đoạn lai giữa DNA biến tính và mồi ngẫu nhiên DIG).

Bước 4: Ngưng phản ứng bằng cách thêm vào 2 µl EDTA 0,2M pH = 8 và ủ ở 65 ^{o}C trong 10 phút (có thể bỏ qua bước thêm EDTA). Có thể dùng ngay hoặc trữ ở -20 ^{o}C.

9.5. Lai mẫu dò với màng Southern blot

1) Để màng trong ống lai và thêm đệm tiền lai (đã làm nóng ở 68 ^{o}C) cho ngập màng (25-30 ml). Tiền lai màng ở 42 ^{o}C trong 30 phút, quay ống lai 12 vòng/phút. Đây là điều kiện cần trước khi lai.
2) Thêm mẫu dò đã biến tính (ủ 5 phút ở 100 ^{o}C, sau đó để ngay lên đá) vào đệm lai (đã làm nóng ở 42 ^{o}C) và mix thật kỹ (sử dụng 25 ng mẫu dò/ml đệm lai). Tất cả đều thao tác trên đá. Sử dụng 8ml đệm lai/ màng 10cm x 10 cm.
3) Loại bỏ đệm tiền lai và thay thế bằng dung dịch lai. Việc lai được thực hiện ở 42 ^{o}C trong 4giờ - qua đêm, tốc độ quay tương tự lúc tiền lai, không để bọt khí xuất hiện (dung dịch lai chứa mẫu dò có thể được tái sử dụng nếu trữ ở - 20 ^{o}C và trước khi sử dụng lại thì ủ ở 68 ^{o}C trong 10 phút).
4) Loại bỏ dịch lai và thay thế bằng dung dịch rửa I. Rửa ở 15-25 ^{o}C trong 5 phút.

Loại bỏ dịch rửa và lặp lại.

5) Loại bỏ dung dịch rửa I và rửa với dung dịch rửa II (đã được làm nóng ở 68 ^{o}C trong 5 phút). Để ở 68 ^{o}C trong 30 phút, tốc độ quay ống tương tự lúc lai. Loại bỏ dung dịch rửa và lặp lại.
6) Loại bỏ dịch rửa II và thay thế bằng dung dịch rửa III. Rửa ở nhiệt độ phòng trong 1-5 phút.
7) Loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa, ủ trong 100ml dung dich Blocking ở nhiệt độ phòng
8) Loại bỏ dung dich Blocking, ủ 30 phút trong 30 ml dung dịch kháng thể ở nhiệt độ phòng
9) Loại bỏ dung dịch kháng thể, rửa 2 x 15 phút trong 100ml dịch rửa III
10) Loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa, cân bằng 2-5 phút trong 40 ml đệm dò
11) Đặt màng vào hộp hiện phim (mặt có DNA ngửa lên trên), nhỏ 1 ml CSDP, ngay lập tức đóng hộp để cho cơ chất lan rộng, chú ý tránh bọt. Ủ 5 phút ở 15-25 ^{o}C, sau đó ủ 10-15 phút ở 37 ^{o}C để tăng cường phản ứng phát quang.
12) Phủ phim lên trên và ủ 15-25 phút hoặc lâu hơn ở 15-25 ^{o}C.
13) Hiện phim X-ray.

Phụ lục 10. Quy trình Northern blot

10.1. Tách chiết RNA *sử dụng Trizol reagent*

1- Lá bông của cây xử lý thuốc trừ cỏ được thu vào các ống corning, cho ngay vào bình chứa nitơ lỏng, tiến hành tách chiết ngay lập tức.
2- Nghiền nhanh mẫu trong nitơ lỏng (hoặc trong 0,75 ml Trizol), chuyển bột mịn vào trong ống effpendort 2ml.
3- Bổ sung 750 µl Trizol reagent (nếu không sử dụng khi nghiền mẫu), đảo đều, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
4- Li tâm 12,000 v/p trong 10 phút, hút dịch nổi sang ống effpendort 2ml mới.
5- Bổ sung tỉ lệ 200µl Chloroform, lắc mạnh, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
6- Li tâm 12,000v/p trong 10 phút, hút dịch nổi sang ống effpendort 2ml mới, bổ

sung Isopropanol lạnh với tỉ lệ 1:1 so với dịch nổi.

7- Đảo đều, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng, li tâm 12,000v/p trong 10 phút. Đổ bỏ dịch nổi thu phần cặn phía dưới.
8- Rửa cặn với cồn 70%. Làm khô cặn bằng máy Speedvac, hòa tan cặn trong nước 20-30µl DEPC 0,01%. Bảo quản mẫu trong tủ -20 ^{o}C.
9- Lấy 3µl RNA để kiểm tra chất lượng trên gel agarose 1,2%.

11.2. Điện di* RNA *bằng gel agarose chứa formaldehyde

1- Rửa sạch dụng cụ của bộ điện di bằng Javen, rửa kỹ bằng nước và tráng bằng nước cất vô trùng, Lau khô bằng cồn 70%.
2- Đặt bộ điện di vào tủ hood, lắp hộp...
3- Nấu tan 0,5g agarose trong 30ml dH_2O vô trùng. Làm nguội đến 55-60 ^{o}C, thêm 5ml 10X MOPS buffer và 3,75ml dung dịch 37% formaldehyde. Cho thêm dH_2O vô trùng đến 50ml.
4- Trút gel vào khay, để khoảng 30 phút.
5- Mix mẫu RNA với đệm theo tỷ lệ 1:3 (v/v): 67 phần formamide khử ion, 20 phần dung dịch formaldehyde và 13 phần 10X MOPS (và 100µg/µl ethydium bromide). Làm nóng ở 60 ^{o}C trong 5 phút, sau đó để ngay lên đá, spin, bổ sung 0,2 vol loading dye.
6- Chuyển lược ra khỏi gel, load toàn bộ mẫu vào giếng, đổ vừa ngập đệm 1X MOPS. Chạy khoảng 45 phút, cường độ dòng điện 80 mA.
7- Lấy gel ra khỏi đệm, ngâm bằng nước cất có bổ sung 1% (w/v) glycine trong 60 phút, sau đó nhuộm với 10mg/ml ethydium bromide (nếu không cho trong quá trình điện di), rửa lại bằng nước và soi trên đèn UV.

10.3. Northern blot

I. Chuẩn bị dụng cụ

- Thiết bị điện di.
- Thước kẻ, bút chì mềm, kéo
- Giấy thấm
- Hộp nhựa có nắp chặt

- Hộp đáy nông 28 x 51 cm
- Cốc đong 500 ml
- Ống lai
- Tấm kính hoặc nhựa (20 x 30 cm).
- Bể nước ổn nhiệt
- Thiết bị chụp gel

Ghi chú: dụng cụ nhựa đã được ngâm qua dung dịch DEPC 0,1% qua đêm và hấp khử trùng, dụng cụ thủy tinh phải được sấy khô ở 120 ^{o}C.

II. Chuẩn bị các dung dịch

1) 20X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M trisodium citrate, pH= 7,0. Cân 175,3 g NaCl và 88,2 g sodium citrate cho vào 800 ml nước, chỉnh pH tới 7,0 bằng NaOH 10 N, thêm nước cho đủ 1 lít, hòa tan và hấp vô trùng (pha 2 lít/lần).

2) 10% SDS: Hòa tan 2 g SDS trong 18 ml nước, làm nóng đến 68 ^{o}C để hỗ trợ việc hòa tan, chỉnh pH đến 7,2 bằng HCl. Thêm nước cho đủ 20 ml.

3) 5 M NaCl

4) 10N NaOH

5) Maleic acid: 0.1M Maleic acid, 0.1M NaCl, pH 7,5

6) Dung dịch biến tính: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

7) Dung dịch trung hòa: 3,0 M NaCl, 0,5 M tris-HCl, pH= 8

8) Dung dịch tiền lai: Dig Easy Hyb, pha theo hướng dẫn của kít

9) Dung dịch lai: Dung dịch tiền lai + mẫu dò.

10) Dung dịch rửa I: 2x SSC, 0,1% SDS

11) Dung dịch rửa II: 0,5x SSC, 0,1% SDS

12) Dung dịch rửa III: Dung dịch Maleic acid, 0,3% Tween 20

13) Dung dịch dò tìm : 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl; pH 9.5.

Chú ý: Các dung dịch được pha trong nước DEPC khử RNase

III. Blotting

(a) Điện di RNA

- Trong 1 bình tam giác 100ml, trộn: 0,6g agarose, 5 ml đệm MOPS 10X và 34 ml

nước cất khử trùng. Những thành phần này được nấu tan, sau đó để nguội dần dần trước khi thêm 11 ml formaldehyde (37%). Đổ gel và cắm lược vào.

- Trong 1 ống microcentrifuge 1,5 ml, trộn: 1µl đệm MOPS 10X, 3,5 µl formaldehyde (37%), 5.5 µl chứa 10 µg RNA trong nước cất khử trùng và 10 µl formamide khử ion. Làm nóng mẫu ở 55 ^{o}C trong 15 phút và sau đó thêm 3 µl loading buffer.
- Hút mẫu, bao gồm cả 1 mẫu RNA marker cho vào giếng, và chạy ở 60 mA khoảng 2h, hoặc cho đến khi dye chạy cách từ cuối bản gel 2-3cm.

b) Chuyển RNA lên màng

1) Cắt màng nilon thành miếng cho phù hợp với kích thước của gel, ngâm màng trong nước cất vô trùng sau đó là đệm chuyển (cho lượng vừa đủ dìm ngập ướt màng hoàn toàn) và giữ nguyên cho đến khi cho vào bể thấm chuyển.
2) Chú ý, màng nilon rất dễ bị hỏng, cần đeo găng tay và luôn cầm ở góc để tránh chầy xước và bị uốn cong. Sử dụng bút chì viết những thông tin cần thiết lên phần rìa chỗ tiếp xúc với gel.
3) Cắt 2 miếng giấy Whatman 3MM cùng kích thước với gel và ngâm trong đệm chuyển (giấy được thấm ướt đều nhưng không để bọt khí xuất hiện).
4) Đặt miếng xốp dày 4-6 cm hoặc lật úp khay đổ gel vào trong khay nhựa và đổ ngập đệm chuyển (20X SSC).
5) Phủ giấy bóng kính lên xốp (nếu là khay đổ gel thì không cần), phủ cầu giấy lên.
6) Lấy gel đặt úp lên trên giấy Whatman 3MM, kiểm tra không cho bọt khí xuất hiện, loại bỏ bọt bằng pipet. Cắt 1 miếng nhỏ phía góc cuối gel và ghi lại góc đã cắt liên quan tới các vị trí của RNA trên gel.
7) Cẩn thận đặt màng nylon lên trên gel (màng đã được làm ẩm trong 20X SSC, đặt úp mặt đã ghi chú), chắc chắn không có sự xuất hiện của bọt khí. Cắt góc của màng và đảm bảo các lane RNA được phủ hoàn toàn.
8) Ngáng parafilm hoặc giấy bóng kính xung quanh gel để che phần dư của giấy Whatman 3MM, che luôn cả những chỗ gel hở, đảm bảo chỉ có một đường dẫn chuyển từ gel lên màng.
9) Đặt 2 miếng giấy Whatman 3MM đã ngâm trước đó (cùng kích thước với gel)

lên màng.

10) Để vài giây cho khô miếng giấy trên cùng. Đặt tháp giấy thấm khô dày 10-15 cm lên trên.
11) Để 1 miếng kính hay nắp nhựa lên trên tháp giấy.
12) Đặt vật nặng thích hợp (tương đương 500 g) lên trên cùng.
13) Blotting từ 18-24 giờ ở nhiệt độ phòng.
14) Tháo dỡ màng: Đeo găng tay, cẩn thận loại bỏ từng phần trên gel, dùng bút chì mềm chọc thủng các giếng để đánh dấu vị trí các giếng trên màng. Bóc gel và giấy Whatman 3MM ra khỏi màng, dùng kẹp đặt màng lên miếng giấy Whatman 3MM khác (đã ngâm trong 2X SSC) sau đó phủ 1 miếng nữa lên trên.
15) Lấy màng ra, rửa trong 2X SSC, sau cố định RNA bằng cách nướng ở 120 ^{o}C trong 30 phút hoặc UV Crosslink màng trên máy UV trong 3 phút/mặt.
16) Sử dụng ngay hoặc cất trong túi nilon để trữ trong ngăn mát tủ lạnh.

IV. Đánh dấu mẫu dò (theo kít *"Dig Northern Starter Kit"*, Cat. số : 12 039 672 910 của Hãng Roche).

CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Bước 1: Bổ sung 1 µg hoặc 4µl sản phẩm RT-PCR (100 – 200 ng) sạch RNase, xử lí bằng DMPC hoặc DEPC, thêm nước cất 2 lần sao cho thể tích cuối cùng trong ống phản ứng là 10µl

Bước 2: Bổ sung các chất trong điều kiện lạnh

Thuốc thử	Thể tích
Labeling mix, 5x (ống 1a)	4 µl
Transcription buffer 5x (ống 1b)	4 µl
RNA polymerase (T7 và T3)	2 µl

- Mix đều và spin
- Ủ trong 1 giờ ở 42 ^{o}C

Bước 3: Bổ sung 2 µl Dnase I, sạch RNase để loại bỏ DNA mẫu.

Ủ trong 15 phút ở 37 ^{o}C

Bước 4: Ngừng phản ứng bằng cách thêm 2 µl EDTA 0,2M (pH = 8.0)

V. Lai mẫu dò với màng northern blot

1) Để màng trong ống lai và thêm đệm tiền lai (đã làm nóng ở 68 ºC) cho ngập màng (25-30 ml). Tiền lai màng ở 68 ºC trong 30 phút, quay ống lai 12 vòng/phút. Đây là điều kiện cần trước khi lai.
2) Thêm mẫu dò đã biến tính (ủ 5 phút ở 100 ºC, sau đó để ngay lên đá) vào đệm lai (đã làm nóng ở 68 ºC) và mix thật kỹ (sử dụng 25 ng mẫu dò/ml đệm lai). Tất cả đều thao tác trên đá. Sử dụng 8ml đệm lai/ màng 10cm x 10 cm.
3) Loại bỏ đệm tiền lai và thay thế bằng dung dịch lai. Việc lai nên được thực hiện ở 42 ºC trong 4giờ - qua đêm, tốc độ quay tương tự lúc tiền lai, không để bọt khí xuất hiện (dung dịch lai chứa mẫu dò có thể được tái sử dụng nếu trữ ở - 20 ºC và trước khi sử dụng lại thì ủ ở 68 ºC trong 10 phút).
4) Loại bỏ dịch lai và thay thế bằng dung dịch rửa I. Rửa ở 15-25 ºC trong 5 phút. Loại bỏ dịch rửa và lặp lại.
5) Loại bỏ dung dịch rửa I và rửa với dung dịch rửa II (đã được làm nóng ở 68 ºC trong 5 phút). Để ở 68 ºC trong 30 phút, tốc độ quay ống tương tự lúc lai. Loại bỏ dung dịch rửa và lặp lại.
6) Loại bỏ dịch rửa II và thay thế bằng dung dịch rửa III. Rửa ở nhiệt độ phòng trong 1-5 phút.
7) Loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa, ủ trong 100ml dung dịch Blocking ở nhiệt độ phòng
8) Loại bỏ dung dịch Blocking, ủ 30 phút trong 30 ml dung dịch kháng thể ở nhiệt độ phòng
9) Loại bỏ dung dịch kháng thể, rửa 2 x 15 phút trong 100ml dịch rửa III
10) Loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa, cân bằng 2-5 phút trong 40 ml đệm dò
11) Đặt màng vào hộp hiện phim (mặt có RNA ngửa lên trên), nhỏ 1 ml CSDP, ngay lập tức đóng hộp để cho cơ chất lan rộng, chú ý tránh bọt. Ủ 5 phút ở 15-25 ºC, sau đó ủ 10-15 phút ở 37 ºC để tăng cường phản ứng phát quang.
12) Phủ phim lên trên và ủ 15-25 phút hoặc lâu hơn ở 15-25 ºC.
13) Hiện phim X-ray.

Phụ lục 11.1. Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng kanamycin và chống chịu Glufosinate của cây chuyển gen pCB301:*bar* (tháng 3/2014)

Mô sẹo	T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng kanamycin	Đánh giá tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			PCR *bar*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
barII1	CB1	125	21,6	0				
barII1	CB2	30	23,3	0				
barII2	CB3	112	23,2	8	7,1	x	+	1
barII3	CB4	70	18,6	0				
barII4	CB5	36	19,4	6	16,7		+	
barII5	CB6	8	25,0	0				
barII1	CB7	26	23,1	0				
barII1	CB8	11	27,3	0				
barII2	CB9	43	23,3	4	9,3		+	
barII5	CB10	86	22,1	0				
barII5	CB11	35	17,1	0				
barII4	CB12	19	36,8	3	15,8		+	
barII4	CB13	47	31,9	7	14,9		+	
barII5	CB14	26	23,1	0				
barII2	CB15	95	29,5	11	11,6	x	+	1
barII3	CB16	54	20,4	0				
barII3	CB17	83	19,3	0				
barII3	CB18	102	21,6	0				
barII3	CB19	24	29,2	0				
barIIF1	CFB1	49	28,6	0				
barIIF2	CFB2	73	16,4	11	15,1	x	+	1
barIIF3	CFB3	21	33,3	0				
barIIF4	CFB4	36	25,0	0				
barIIF5	CFB5	14	21,4	0				

Mô sẹo	T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng kanamycin	Đánh giá tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			PCR *bar*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
barIIF6	CFB6	107	31,8	15	14,0	x	+	1
barIIF1	CFB7	62	21,0	0				
barIIF1	CFB8	28	28,6	0				
barIIF3	CFB9	37	29,7	0				
barIIF3	CFB10	16	37,5	0				
barIIF3	CFB11	29	20,7	0				
barIIF6	CFB12	61	27,9	8	13,1		+	
barIIF6	CFB13	84	40,5	14	16,7		+	
barIIF6	CFB14	72	30,6	11	15,3		+	
barIIF4	CFB15	38	21,1	0				
barIIF4	CFB16	29	13,8	0				
barIIF2	CFB17	16	31,3	2	12,5		+	
barIIF2	CFB18	42	31,0	9	21,4		+	1
barIIF2	CFB19	69	23,2	6	8,7		+	
barIIF5	CFB20	75	17,3	0				
barIIF2	CFB21	87	28,7	8	9,2		+	
barIIF5	CFB22	11	36,4	0				
barIIF5	CFB23	36	27,8	0				
barIIF2	CFB24	45	31,1	7	15,6		+	
barIIF5	CFB25	17	29,4	0				
barIIF2	CFB26	68	30,9	12	17,6		+	
barIIF2	CFB27	93	24,7	9	9,7		+	
barIIF5	CFB28	34	35,3	0				
Coker310		35	0	0				

Phụ lục 11.2. Số cây mọc, số cây kháng, tỷ lệ (%) kháng hygromycin và chống chịu Glufosinate cây chuyển gen pCAMBIA1300:*bar*

Mô sẹo	T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygromycin	Đánh giá tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			PCR *Bar*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
barI1	B1	132	79,5	82	62,1	x	+	1
barI2	B2	16	81,3	13	81,3	x	+	2
barI3	B3	84	78,6	59	70,2	x	+	
barI2	B4	42	71,4	34	81,4	x	+	2
barI4	B5	16	37,5	0				
barI3	B6	66	77,3	45	68,2	x	+	1
barI1	B7	8	50,0	4	50,0		+	
barI*	B8	59	33,9	17	28,8		+	
barI4	B9	198	72,2	142	71,7	x	+	1
barI1	B10	14	71,4	8	57,1		+	
barI1	B11	26	65,4	15	57,7		+	
barI4	B12	2	100	0				
barI*	B13	25	48,0	9	36,0		+	
barI4	B14	26	38,5	0				
barI1	B15	50	60,0	28	56,0		+	
barI1	B16	44	65,9	23	52,3		+	
barI4	B17	17	17,6	0				
barI4	B18	111	36,9	36	32,4	x	+	1
barI*	B19	23	43,5	10	43,5		+	
barI3	B20	36	88,9	32	62,8	x	+	
barI4	B21	29	31,0	0				
barI4	B22	9	22,2	0				
barI4	B23	20	35,0	0				

Mô sẹo	T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygro mycin	Đánh giá tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			PCR *Bar*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
barI4	B24	11	81,8	0				
barI3	B25	30	63,3	17	56,7		+	
barI4	B26	12	66,7	0				
barI*	B27	18	38,9	5	27,8		+	
barI*	B28	37	56,8	18	48,6		+	
barI*	B29	46	41,3	15	32,6		+	
barI4	B30	32	18,8	0				
barIF1	BF1	43	72,1	0				
barIF2	BF2	58	44,8	21	36,2		+	
barIF3	B20	36	88,9	32	62,8	x	+	
barIF7	BF4	16	37,5	0				
barIF8	BF5	30	86,7	22	73,3		+	
barIF6	BF6	13	30,8	1	7,7		+	
barIF5	BF7	48	37,5	6	12,5		+	
barIF3	BF8	102	61,8	52	51,0	x	+	
barIF1	BF9	36	22,2	0				
barIF2	BF10	53	50,9	18	34,0		+	
barIF1	BF11	18	16,7	0	0		+	
barIF2	BF12	91	45,1	36	39,6	x	+	
barIF1	BF13	11	63,6	0				
barIF5	BF14	16	31,3	3	18,8		+	
barIF3	BF15	35	45,7	15	42,9		+	
barIF8	BF16	26	80,8	21	80,8		+	
barIF3	BF17	82	59,8	42	51,2	x	+	1
barIF1	BF18	24	37,5	0				

Mô sẹo	T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygro mycin	Đánh giá tính chống chịu Glufosinate (0,6 kg ai./ha)			PCR *Bar*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
barIF6	BF19	51	21,6	6	11,8		+	
barIF1	BF20	14	57,1	0			+	
barIF3	BF21	26	69,2	14	53,8		+	
barIF4	BF22	31	74,2	23	74,2		+	
barIF1	BF23	12	16,7	0				
barIF1	BF24	7	57,1	0				
barIF4	BF25	42	78,6	30	71,4	x	+	
barIF3	BF26	36	66,7	19	52,8		+	
barIF3	BF27	25	76,0	14	56,0		+	
barIF2	BF28	62	33,9	21	33,9		+	
barIF3	BF29	41	68,3	22	53,7		+	
barIF3	BF30	12	91,7	7	58,3		+	
barIF6	BF31	19	52,6	0				
barIF6	BF32	27	29,6	0				
barIF3	BF33	16	56,3	8	50,0		+	
barIF2	BF34	54	53,7	23	42,6		+	
barIF3	BF35	22	72,7	14	63,6		+	
barIF5	BF36	34	41,2	8	23,5		+	
barIF6	BF37	19	31,6	0				
barIF5	BF38	48	29,2	11	22,9		+	
barIF3	BF39	18	77,8	9	50,0		+	
Coker 310			0	0	0			
Coker 310			0	0	0			

Phụ lục 11.3. Tỷ lệ (%) cây kháng kháng sinh và chống chịu Glufosinate của các dòng bông chuyển gen *bar* thế hệ T_2

TT	T_1	T_2-dòng …	Tỷ lệ cây kháng KS	Tỷ lệ chống chịu thuốc trừ cỏ	TT	T_1	T_2-dòng …	Tỷ lệ cây kháng KS	Tỷ lệ chống chịu thuốc trừ cỏ
1	B1	1	100,0	100,0	44		3	90,3	86,7
2		2	85,4	83,5	45		4	85,6	83,2
3		3	86,7	83,3	46		5	81,3	77,1
4		4	86,0	93,5	47	B20	1	85,6	85,6
5		5	87,3	85,5	48		2	89,6	84,0
6		6	90,0	89,3	49		3	85,8	84,9
7		7	90,0	88,6	50		4	98,9	97,9
8		8	85,7	82,3	51		5	84,2	73,7
9		9	86,7	84,0	52	B33	1	82,1	77,4
10		10	87,2	86,5	53		2	100,0	100,0
11		11	100,0	100,0	54		3	90,5	90,5
12	B3	1	88,1	85,1	55		4	97,7	93,8
13		2	94,5	92,7	56		5	88,1	86,0
14		3	100,0	100,0	57		6	87,9	87,1
15		4	100,0	100,0	58	B38	1	86,7	85,6
16		5	83,3	82,5	59		2	100,0	94,9
17		6	100,0	99,3	60		3	82,4	70,6
18		7	92,9	88,8	61		4	100,0	97,5
19	B6	1	98,9	95,5	62		5	91,8	88,4
20		2	92,0	85,0	63		6	95,5	91,7
21		3	88,6	84,3	64		7	85,7	83,9
22		4	79,6	78,2	65		8	97,8	95,5

TT	T_1	T_2-dòng …	Tỷ lệ cây kháng KS	Tỷ lệ chống chịu thuốc trừ cỏ	TT	T_1	T_2-dòng …	Tỷ lệ cây kháng KS	Tỷ lệ chống chịu thuốc trừ cỏ
23		5	93,7	92,0	66		9	93,0	85,0
24		6	100,0	100,0	67		10	92,3	87,2
25	B9	1	100,0	97,1	68	BF12	1	91,5	78,7
26		2	91,6	85,3	69		2	96,3	93,9
27		3	100,0	100,0	70		3	88,6	84,8
28		4	95,1	82,0	71		4	84,2	79,8
29		5	87,9	79,3	72		5	82,7	79,6
30		6	100,0	91,3	73	BF17	1	100,0	100,0
31		7	81,8	75,8	74		2	86,0	82,5
32		8	94,3	94,3	75		3	77,6	76,6
33		9	92,0	90,5	76		4	97,6	97,6
34		10	87,6	87,6	77		5	91,1	88,7
35		11	80,8	80,8	78		6	75,0	72,3
36		12	91,5	86,8	79		7	92,3	89,4
37		13	97,7	88,4	80		8	88,3	85,2
38		14	100,0	96,9	81	BF25	1	98,1	95,7
39		15	100,0	93,3	82		2	100,0	96,3
40		16	92,7	92,7	83		3	81,0	73,8
41		17	91,2	85,4	84		4	91,4	87,1
42	B18	1	100,0	100,0	85		5	87,4	87,4
43		2	92,2	88,3					

Phụ lục 12.1. Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng kanamycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen pCB301:*EPSPS* thế hệ T_1 (tháng 10/2014)

Dòng T_1	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng kanamycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate (2,88 kg ai./ha)			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
CE1	CE1	48	43,8	15	31,3		+	
CE2	CE2	26	34,6	0				
CE3	CE3	78	59,0	12	15,4		+	
CE4	CE4	92	22,8	11	12,0		+	
CE5	CE5	31	80,6	12	38,7	x	+	1
CE6	CE6	15	53,3	0				
CE7	CE7	27	44,4	0				
CE8	CE8	51	19,6	0				
CE9	CE9	39	66,7	16	41,0		+	1
CE10	CE10	67	23,9	12	17,9		+	
CE11	CE11	22	31,8	0				
CE12	CE12	8	62,5	0				
CE13	CE13	17	47,1	0				
CE14	CE14	34	35,3	3	8,8		+	
CE15	CE15	26	23,1	0				
CE16	CE16	72	36,1	0				
CFE1	CFE1	111	36,9	36,0	32,4		+	1
CFE2	CFE2	59	33,9	17,0	28,8		+	
CFE3	CFE3	25	48,0	9,0	36,0		+	
CFE4	CFE4	50	60,0	20,0	40,0		+	
CFE5	CFE5	44	65,9	21,0	47,7		+	
CFE6	CFE6	23	43,5	0				

Dòng T_1	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng kanamycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate (2,88 kg ai./ha)			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
CFE7	CFE7	36	33,3	0				
CFE8	CFE8	29	31,0	0				
CFE9	CFE9	9	22,2	0				
CFE10	CFE10	20	35,0	0				
CFE11	CFE11	30	63,3	10,0	33,3			
CFE12	CFE12	11	81,8	0				
CFE13	CFE13	30	23,3	0				
CFE14	CFE14	170	20,6	28,0	16,5			
CFE15	CFE15	62	19,4	10	16,1			
CFE16	CFE16	41	63,4	19	46,3	x	+	1
CFE17	CFE17	86	54,7	38	44,2			
CFE18	CFE18	37	35,1	8	21,6			
CFE19	CFE19	12	16,7	0				
Coker310				0	0		-	-
Coker310FR				0	0		-	

Phụ lục 12.2. Số cây mọc, tỷ lệ (%) kháng hygormycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen pCAMBIA1300:*EPSPS* thế hệ T_1

Mô sẹo	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygromycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
EPSI1	E1	12	75,0	0				

Mô sẹo	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygromycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
EPSI1	E2	8	12,5	0				
EPSI1	E3	16	18,8	0				
EPSI1	E4	23	39,1	0				
EPSI1	E5	14	57,1	0				
EPSI1	E6	47	23,4	0				
EPSI2	E7	19	73,7	11	57,9	x	+	1
EPSI3	E8	26	46,2	10	38,5	x	+	1
EPSI4	E9	15	26,7	0				
EPSI5	E10	34	41,2	14	41,2		+	
EPSI4	E11	21	38,1	0				
EPSI4	E12	36	30,6	0				
EPSI4	E13	25	68,0	0				
EPSI5	E14	37	35,1	11	29,7		+	
EPSI6	E15	14	64,3	0				
EPSI6	E16	14	42,9	0				
EPSI7	E17	42	40,5	16	38,1		+	
EPSI6	E18	26	26,9	0				
EPSI7	E19	31	71,0	17	54,8	x	+	1
EPSI7	E20	44	31,8	10	22,7		+	
EPSI7	E21	17	41,2	6	35,3		+	
EPSI8	E22	9	55,6	0				
EPSI7	E23	22	36,4	5	22,7		+	
EPSIF1	EF1	33	42,4	0				
EPSIF1	EF2	16	18,8	0				

Mô sẹo	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygromycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
EPSIF1	EF3	11	72,7	0				
EPSIF4	EF4	47	61,7	22	46,8	x	+	1
EPSIF5	EF5	21	28,6	0				
EPSIF5	EF6	14	42,9	0				
EPSIF5	EF7	16	68,8	0				
EPSIF5	EF8	10	40,0	0				
EPSIF6	EF9	31	41,9	8	25,8		+	
EPSIF5	EF10	34	26,5	0				
EPSIF5	EF11	25	32,0	0				
EPSIF5	EF12	13	46,2	0				
EPSIF5	EF13	6	33,3	0				
EPSIF4	EF14	22	77,3	12	54,5	x	+	1
EPSIF7	EF15	18	33,3	0				
EPSIF4	EF16	25	60,0	11	44,0			
EPSIF7	EF17	15	26,7	0				
EPSIF7	EF18	24	37,5	0				
EPSIF7	EF19	17	17,6	0				
EPSIF4	EF20	12	83,3	6	50,0		+	
EPSIF6	EF21	34	35,3	11	32,4		+	
EPSIF6	EF22	36	16,7	5	13,9		+	
EPSIF6	EF23	14	57,1	5	35,7		+	
EPSIF6	EF24	23	52,2	9	39,1		+	
EPSIF8	EF25	17	76,5	11	64,7	x	+	
EPSIF9	EF26	25	24,0	0				

Mô sẹo	Tên T_0	Số cây mọc	Tỷ lệ (%) kháng hygromycin	Đánh giá tính chống chịu Glyphosate			PCR *EPSPS*	Số bản sao
				Số cây sống	Tỷ lệ (%)	Dòng chọn		
EPSIF9	EF27	28	17,9	0				
EPSIF9	EF28	15	60,0	0				
EPSIF9	EF29	20	25,0	0				
EPSIF10	EF30	16	43,8	0				
EPSIF10	EF31	11	72,7	0				
EPSIF8	EF32	42	21,4	5	11,9		+	
EPSIF10	EF33	37	27,0	0				
EPSIF8	EF34	11	54,5	4	36,4		+	
EPSIF8	EF35	23	39,1	6	26,1		+	
Coker 310			**0**	**0**	**0**			
Coker 310			**0**	**0**	**0**			

Phụ lục 12.3. Tỷ lệ (%) kháng kanamycin và tỷ lệ cây chống chịu Glyphosate của cây chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_2 (tháng 8 năm 2015)

TT	T_1	T_2-Dòng số	Tỷ lệ (%) cây kháng KS	Tỷ lệ (%) cây chống chịu thuốc trừ cỏ	TT	T_1	T_2-Dòng số	Tỷ lệ (%) cây kháng KS	Tỷ lệ (%) cây chống chịu thuốc trừ cỏ
1	E8	2	100,0	100,0	24		3	53,1	49,0
2		7	100,0	100,0	25		4	90,2	90,2
3	E17	1	76,4	70,8	26	CE17	1	81,8	76,4

TT	T_1	T_2-Dòng số	Tỷ lệ (%) cây kháng KS	Tỷ lệ (%) cây chống chịu thuốc trừ cỏ	TT	T_1	T_2-Dòng số	Tỷ lệ (%) cây kháng KS	Tỷ lệ (%) cây chống chịu thuốc trừ cỏ
4		2	81,9	77,1	27		2	52,1	50,2
5	E27	1	78,0	73,7	28		3	93,5	90,2
6		2	80,8	77,9	29		4	84,4	84,4
7		1	100,0	100,0	30		5	73,4	54,8
8	E37	4	100,0	100,0	31		6	100,0	94,4
9		8	100,0	100,0	32		7	83,2	83,2
10		10	100,0	100,0	33		8	47,1	45,3
11	E48	1	75,0	71,9	34		9	30,9	30,9
12		2	65,9	65,9	35		10	96,8	92,2
13	ME2	1	77,8	72,8	36		11	88,9	87,2
14		2	100	100	37		12	100,0	100,0
15		3	51,7	51,7	38		13	64,4	61,5
16		4	96,4	91,7	39	CE32	1	78,1	75,8
17		5	87,5	87,5	40		2	92,5	81,8
18		6	57,1	48,4	41		3	60,6	60,6
19	CE5	1	78,1	74,9	42		4	97,3	95,1
20		2	96,1	91,4	43		5	100,0	97,9
21		3	84,7	75,9	44		6	48,0	46,7
22	CE9	1	78,2	75,9	45		7	87,9	83,6
23		2	100,0	100,0					