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

Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Phan Thanh Kiếm
TS. Bùi Minh Trí

Phản biện1:
Phản biện2:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm Luận án cấp Trường họp tại Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh
Vào hồi…..giờ, ngày……tháng……năm ……

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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 năng suất, sản lượng và phẩm chất cây trồng. Trong số các biện pháp phòng trừ thì biện pháp sử dụng các loại thuốc diệt cỏ đã, đang và luôn là biện pháp đạt hiệu quả nhanh chóng và phổ biến. Hiện nay, bằng kỹ thuật chuyển các gen chống chịu thuốc diệt 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. Việc chấp thuận cây bông biến đổi gen đã tạo bước phát triển đột phá cho ngành sản xuất bông thế giới. 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 có tiềm năng lớn cho việc chấp thuận cây bông công nghệ sinh học vì hiện là nước phát triển nhanh nhất về công nghiệp dệt may (FAO, 2018). Nguồn cung bông 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 (USDA, 2019). 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 chống chịu thuốc diệt cỏ là cần thiết.

Có nhiều phương pháp chuyển gen quan tâm vào thực vật mục tiêu. Chuyển gen qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens* là

phương pháp được ưa thích để đưa gen chuyển vào genome 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 diệt 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 diệt 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 được tiến hành.

Mục tiêu của đề tài

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

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

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 diệt 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.

Bố cục của luận án

Luận án chính thức gồm 120 trang (không bao gồm phụ lục), có 3 chương, 21 bảng số liệu và 25 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 111 tài liệu trong đó 12 tài liệu tiếng Việt và 99 tài liệu tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Sơ lược về cây bông

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

1.3 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc diệt cỏ

1.3.1 Cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc diệt cỏ

1.3.2 Cây bông biến đổi gen chống chịu thuốc diệt cỏ

1.4 Cây bông biến đổi gen ở Việt Nam

1.5 Thuốc diệt cỏ và gen chống chịu thuốc diệt cỏ

1.5.1 Thuốc diệt cỏ

1.5.2 Gen kháng kháng thuốc diệt cỏ

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

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

1.6.2 Vector biểu hiện ở thực vật

1.6.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen

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

1.7.1 Chuyển gen vào cây bông thông qua *A. tumefaciens*

Cho đến nay, tái sinh *in vitro* cây bông chỉ quan sát được ở các kiểu gen Coker-312, 310, 201 và 315 (*G. hirsutum*) có nguồn gốc Hoa kỳ. Trong hầu hết các nghiên cứu, chủ yếu sử giống Coker312 cho chuyển gen. 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).

1.7.2 Chuyển gen cây bông qua *A. tumefaciens* ở Việt Nam

Ở Việt Nam, nghiên cứu chuyển gen cây bông thông qua *A. tumefaciens* bắt đầu từ 2001 (Lê Trần Bình và Lê Thị Muội, 2005). 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 thông qua *A. tumefaciens* cho giống này, nhưng chưa tạo được cây bông chuyển gen.

Trịnh Minh Hợp đã nghiên cứu quy trình tái sinh thông qua tạo phôi soma cho 2 giống SSR60F và Coker312, sau đó, chuyển gen *Cry*IAc vào 2 giống này thông qua *A. tumefaciens*, tạo được 7 dòng bông chuyển gen đồng thời mang gen *hpt* kháng hygromycin, *CryIAc* và có tính kháng sâu xanh, với tỷ lệ giết sâu 44 – 70% (Trịnh Minh Hợp, 2012).

Phân lập và thiết kế vector tái tổ hợp mang gen điều khiển chịu hạn *DREB2ACA* và gen chức năng chịu hạn *Gal*. Sau đó, chuyển gen *DREB2ACA* vào giống SSR60F và Coker312 thông qua *A. tumefaciens* với tỷ lệ mô sẹo chuyển gen phát sinh phôi 0,87 – 1,27% và tạo được 3 dòng D2, D3 và D40 có khả năng chịu hạn (Lê Trọng Tình và ctv, 2014).

Để chuyển gen thành công vào cây bông cần có hai quy trình tối ưu hóa: (i) tối ưu hóa các tham số trong quy trình nuôi cấy mô, 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,... Hai bộ 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

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

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

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

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

1.8.5 Di truyền gen chuyển

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 6 thí nghiệm nghiên cứu tác động của mật độ vi khuẩn (OD), thời gian lây nhiễm, thời gian đồng nuôi cấy, ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi cấy, nồng độ AS đến hiệu quả chuyển gen và lựa chọn loại mẫu 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 diệt cỏ

Nội dung 3 Phân tích di truyền tính chống chịu thuốc diệt cỏ Basta, 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 Coker310

Các dòng bông Coker310FR được tái sinh liên tục qua 3 thế hệ theo quy trình tái sinh cây bông, trong đó hai giai đoạn cảm ứng mô sẹo và nẩy mầm phôi được thực hiện trên các môi trường.

Thí nghiệm 1: Lựa chọn môi trường cảm ứng mô sẹo, 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 và nuôi 4 tuần.

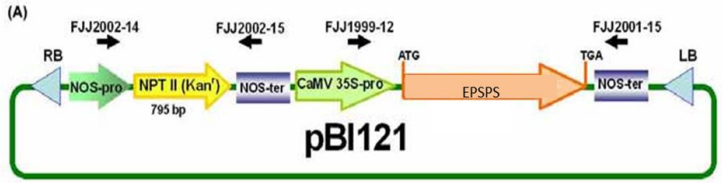
Thí nghiệm 2: Lựa chọn môi trường nẩy mầm phôi, gồm 12 môi trường GR có các thành phần thay đổi về MSB5 glucose và gelrite.

2.2.1.2 Tái cấu trúc các vector chuyển gen

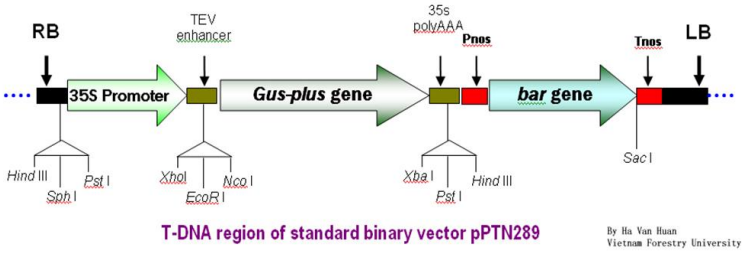
Vật liệu: Vi khuẩn *E. coli* chủng *DH*5α được sử dụng để nhân

dòng gen; Vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58/PGV2260 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, gen *EPSPS* mã hóa cho enzyme *3-phosphoshikimate-1-carboxyvinyl transferase* (biểu hiện chống chịu thuốc diệt cỏ gốc glyphosate). Vector pPTN289 chứa cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS (sơ đồ hình 2.2), gen *bar* có nguồn gốc từ *Streptomyces hygroscopicus* biểu hiện *bialaphos acetyltransferase* chống chịu thuốc diệt cỏ gốc glufosinate; Hai vector chuyển gen vào thực vật pCB301:*npt*II và pCAMBIA1300:*hpt* được sử dụng làm vector chuyển gen.



Hình 2.1 Cấu trúc PCaMV35S-*EPSPS*-TNOS



Hình 2.2 Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS

Primer đặc hiệu: Năm cặp primer đặc hiệu để PCR nhân 5 phân đoạn DNA của các gen *hpt*, *npt*II, *bar* và *EPSPS*.

*** 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**

pCB301:*bar* và pCB301:*EPSPS*: Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 và P35S-*EPSPS*-TNos từ vector pBI121 được cắt bằng *Hin*dIII, xử lý tạo đầu bằng nhờ Klenow Fragment. Cắt rời 2 này cấu trúc 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, 2 cấu trúc trên được gắn với vector pCB301 bằng enzyme T4 *ligase*.

pCAMBIA1300:*bar* và pCAMBIA1300:*EPSPS*: Cấu trúc PNOS-*bar*-TNOS trong vector pPTN289 và P35S-*EPSPS*-TNOS từ vector pBI121 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*.

04 vector chuyển gen được 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 bằng phản ứng colony-PCR 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 *vir*C cũng được khuếch đại bằng phản ứng colony-PCR.

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.

Thí nghiệm 1: Tác động của mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* lây nhiễm, gồm 6 mật độ 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 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 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 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.
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 vector (pCB301 và pCAMBIA1300).

2.2.1.4 Chuyển gen bar và EPSPS vào giống Coker310 và Coker310FR

Vật liệu: mẫu lá mầm và thân mầm của giống bông Coker310 và 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 dây và sử dụng các thông số đã chọn ở các thí nghiệm thuộc mục 2.2.1.3. Tiến hành 2 thí nghiệm sau:
Thí nghiệm 1: Chuyển gen *bar* và *EPSPS* vào giống vào mẫu lá mầm Coker310 và Coker310FR, gồm 4 nghiệm thức.

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 giống vào mẫu thân mầm Coker310 và Coker310FR, gồm 4 nghiệm thức.

1 Thân mầm Coker310- pCB301:*EPSPS*

2 Thân mầm Coker310FR - pCB301:*EPSPS*

3 Thân mầm Coker310- pCB301:*bar*

4 Thân mầm Coker310FR-pCAMBIA1300:*bar*

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, 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

2.2.2 Chọn lọc dòng bông chuyển gen chống chịu thuốc diệt 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

Chọn lọc dòng bông chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot

Tạo mẫu dò để lai DNA/DNA theo kít "DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II" (cat. 11 585 614 910). 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 20 µg DNA tổng số của các cây chuyển gen thế hệ T_1 và giống gốc không chuyển gen bằng enzyme (pCB301:*EPSPS/Pst*I, pCAMBIA1300: *EPSPS*/*Eco*RI, pCB301:*bar*/*Eco*RI, pCAMBIA1300:*bar*/*Eco*RI). Đối chứng dương là các plasmid được cắt bằng enzyme. Điện di qua đêm sản phẩm cắt trên gel agarose 0,8%. Thấm truyền DNA lên màng lai (Amersham, Buckinghamshire, UK), lai và dò tìm băng lai.

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, sử dụng Trizol regent (cat. số 10296010). Phân tách 10 µg RNA 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 thực hiện phép lai. Tạo mẫu dò để lai DNA/RNA theo kít "DIG Northern stater" (cat. 12 039 672 910).

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

Đánh giá tính chống chịu thuốc gốc glufosinate: Phun thuốc diệt cỏ ở nồng độ 0,6 kg ai./ha vào cây bông chuyển gen giai đoạn cây 3-4 lá và 10-12 lá.

Đánh giá tính chống chịu thuốc gốc glyphosate: Phun thuốc diệt cỏ ở nồng độ 2,88 kg ai./ha ở giai đoạn cây 3-4 lá và 10-12 lá (khi cỏ mọc rất tốt).

Sau 7 - 10 ngày theo dõi khả năng chống chịu thuốc của cây, mức độ chống chịu theo quy ước sau:

+++++: < 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 diệt 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

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) tạo F1, sau đó tự thụ tạo F2 và lai trở lại với MCU9 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 Basta (0,6 kg 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: chết được dùng để phân tích sự phân ly của gen chuyển.

2.3 Hoá chất

2.4 Máy móc và thiết bị

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

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). 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 (0,1 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin), môi trường có nồng độ 2,4-D và kinetin cao hơn hoặc thấp hơn đều cho tỷ lệ phát sinh phôi thấp hơn. 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 mô sẹo phát sinh phôi.

Thay đổi hàm lượng khoáng MS, đường và gelrite là cách tạo stress thẩm thấu cho nảy mầm phôi để giảm tỷ lệ cây tái sinh dị dạng. 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 diệt cỏ gốc glyphosate và glufosinate, tạo chủng *A.*

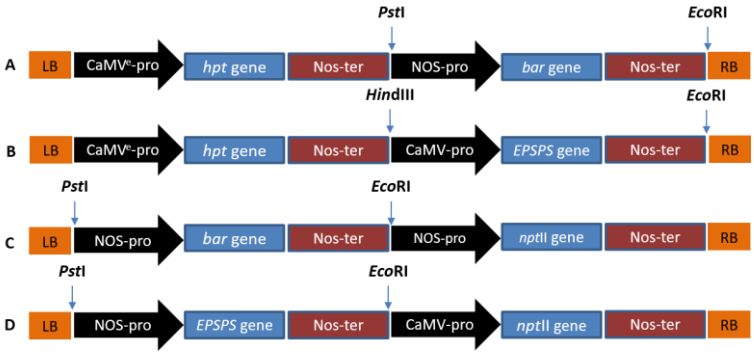
***tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp**

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

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

3.1.2.3 Tạo chủng A. tumefaciens chứa plasmid tái tổ hợp

Bốn vector chuyển gen (sơ đồ hình 3.14) được 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 khuếch đại gen *EPSPS* (1,4 kb), *bar* (0,44 kb), (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 clony - PCR để khẳng định đã chuyển thành công các plasmid vào *A. tumefaciens*.



Hình 3.14 Sơ đồ vùng T-DNA của 4 vector chuyển gen

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

Công thức mật độ khuẩn OD_{600} 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.

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.

Thời gian đồng nuôi cấy ảnh hưởng đến hiệu quả truyền T-DNA vào tế bào thực vật (Kondo và ctv, 2000). Kéo dài thời gian đồng nuôi cấy làm cho *A. tumefaciens* phát triển quá mức và làm giảm hiệu quả chuyển gen (Yongxue và ctv, 2010; Gelvin, 2005). Kết quả nghiên cứu này cho thấy đồng nuôi cấy 64 giờ là tối ưu nhất cho chuyển gen.

Đối với vector pCB301, không khác nhau về tỷ lệ mô sẹo cảm ứng, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn giữa 2 ngưỡng nhiệt độ đồng nuôi 18 ^{o}C và 22 ^{o}C. Đối với vector pCAMBIA1300, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo cao hơn ở ngưỡng 22 ^{o}C. Chọn ngưỡng 22 ^{o}C để chuyển gen vào giống Coker310.

Trong chuyển gen vào giống Coker310 thì không cần sử dụng AS.

Vector pCAMBIA 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 Coker310FR



Hình 3.16 Tái sinh, ra cây và chọn lọc cây chuyển gen T_0.

Giống bông không ảnh hưởng đến tỷ lệ cây chuyển gen không dị dạng nhưng 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. Vector pCAMBIA có tỷ lệ cây mang gen cao hơn (66,4 - 73,8%), nhưng có nhiều cây dị dạng (> 35% số cây), vector pCB301 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.

Có 337 cây chuyển gen *bar* tái sinh trên 2 giống và 2 vector. Sau đánh giá, thu được 47 cây hữu thụ, đồng thời mang gen *npt*II và *bar*; 69 cây hữu thụ, đồng thời mang gen *hpt* và *bar*.

Có 172 cây chuyển gen *EPSPS* tái sinh trên 2 giống và 2 vector. Đã xác định được 96 cây hữu thụ, đồng thời mang gen chọn lọc, gen *EPSPS*. Trong đó, 16 cây CE, 19 cây CFE, 23 cây E và 35 cây CFE.

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

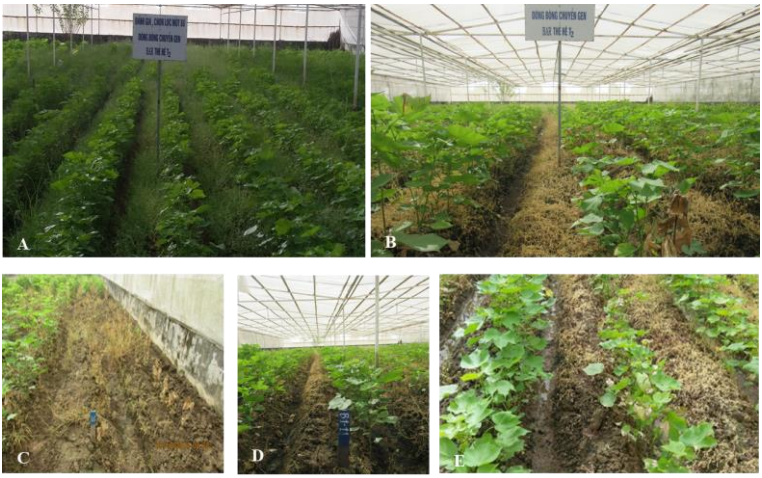
Đánh giá tính chống chịu thuốc diệt cỏ Glufosinate cho 47 dòng mang gen pCB301:*bar* thu được 18 dòng có cây chống chịu glufosinate, nhưng tỷ lệ chống chịu rất thấp, cao nhất đạt 21,4%. Mức độ chống chịu của các dòng đều ở mức yếu - trung bình.

Kết quả xử lý thuốc diệt cỏ cho 69 dòng T_1 chuyển gen pCAMBIA:*bar* thu được 48 dòng có cây chống chịu glufosinate và mức độ chống chịu của các dòng ở mức cao. 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 diệt cỏ như glufosinate 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 diệt cỏ (Everman và ctv, 2009).

Để chắc chắn tính chống chịu thuốc diệt cỏ Glufosinate được tạo ra bởi gen chuyển, 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. Kết quả này 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 DNA từ cây chuyển gen với RNA tổng số của 6 dòng CB3, CB5, B2, B8, B9 và BF17 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



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

Thử nghiệm sinh học về khả năng chịu thuốc diệt cỏ ở cả cây chuyển gen và không chuyển gen thế hệ T_2 cũng được áp dụng với Glufosinate (Hình 3.21). Năm dòng B1, B9, B18 và BF8, BF17 thể hiện mức độ chống chịu cao và ổn định.

Bảng 3.15 Số cây mọc, số cây sống, tỷ lệ (%) cây chống chịu Basta 15SL của 12 dòng bông chọn

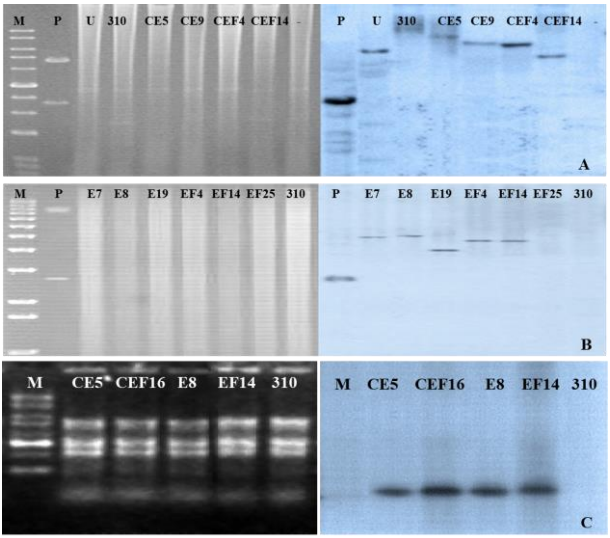
TT	Dòng bông	Số cây mọc	Số cây sống	Tỷ lệ cây sống (%)	Mức độ
1	CB3	112	8	7,1	+++
2	CB15	95	11	11,6	+++
3	CFB2	73	11	15,1	+++
4	CFB6	107	15	14,0	+++
5	CFB18	42	9	21,4	+++
1	B1	132	82	62,1	+++++
2	B2	16	13	81,3	++++
3	B3	84	59	70,2	+++++

4	B4	42	34	81,4	++++
5	B6	66	45	68,2	++++
6	B9	198	142	71,7	+++++
7	B18	111	36	32,4	+++++
8	B20	36	32	62,8	++++
9	BF8	102	52	51,0	+++++
10	BF12	91	36	39,6	++++
11	BF17	82	42	51,2	+++++
12	BF25	42	30	71,4	+++
	Coker310	35	0	0	-

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 chống chịu glyphosate cho sáu dòng vừa có nhiều cây kháng, cây sinh trưởng đồng đều và có mức độ chống chịu tốt hơn cả là E7, E8, E19, EF4, EF14 và EF25.



Hình 3.23 Đánh giá các dòng chuyển gen *EPSPS* thế hệ T_1 bằng Southern blot và Northern blot

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

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 sau khi xử lý với Glyphosate. 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 diệt cỏ Glufosinate, các đặc điểm thực vật học và khả năng mẫn 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 diệt cỏ của các dòng chuyển gen *bar*

Các tổ hợp lai F_1 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. 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 F_2 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 F_2 từ các cặp lai khác nhau đều chỉ ra mô hình di truyền đơn gen.

Tương tự B9, con lai với BF17 không phân ly tính chống chịu thuốc diệt cỏ cũng được tự thụ và hồi giao các tổ hợp được chọn này và đánh giá tính chống chịu thuốc diệt cỏ ở F_2 và BC_1F_1 để khẳng tính di truyền của gen chống chịu thuốc diệt cỏ trong dòng BF17. Kết quả đánh giá ghi nhận tỷ lệ phân ly tính kháng nhiễm thuốc trừ cỏ đúng như dự đoán ở F_2 là 3:1 và BC_1F_1 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 việc chèn phân đoạn 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 F_2 và BC_1F_1 của Coker310/B9 và Coker310/BF17. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho phép chọn được thể đồng hợp tử gen chống chịu thuốc diệt cỏ gốc glufosinate.

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

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…) hoàn toàn tương tự với đối chứng không chuyển gen Coker310. 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, cho thấy, các dòng chuyển gen B9 và BF17 không thể hiện sự sinh trưởng vượt trội, lấn át so với giống nền Coker310.

Các phân tích PCR và Southern blot cho thấy đã tích hợp thành công gen *bar* vào genome Coker310. Thử tính kháng hygromycin và thuốc diệt cỏ cũng cho thấy mức độ chống chịu cao với các hóa chất hygromycin và glufosinate. Đánh giá thêm các đặc điểm thực vật và nông học trong cả B9, BF17 và giống nền cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về những đặc điểm này giữa B9, BF17 và giống nền của chúng. Ngoài ra, nghiên cứu truyền

thống 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; 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 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.

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 diệt 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 diệt 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 diệt 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 gen vào cây bông.
2- Sử dụng 4 vector biểu hiện gen chống chịu thuốc diệt cỏ vào giống bông khác hoặc cây trồng khác để tạo cây trồng có tính chống chịu thuốc diệt 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.