

Chuyên đề: CÔNG NGHỆ CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO

GV thực hiện: Võ Văn Quý

Đơn vị: Trường THPT Chuyên LQĐ - Ninh Thuận

PHẦN I: CƠ SỞ KHOA HỌC CHO QUÁ TRÌNH CHUYỂN GEN

I. Đặc điểm bộ máy di truyền tế bào thực vật:

Các tính trạng của thực vật là biểu hiện của các gen di truyền. Có các tính trạng đơn gen (do 1 gen phụ trách) có những tính trạng đa gen (do tác động phối hợp của nhiều gen)

Về mặt hóa học, gen là 1 dãy nucleotit có số nucleotit và dãy mã tự đặc trưng, số nucleotit cấu tạo nên 1 gen, thường biểu thị theo KG (Kilobase = 1000 nucleotit). Biểu hiện trực tiếp hoạt động của gen là các protein này là các E, nhờ vậy quá trình trao đổi chất, sinh trưởng, phát triển ... của thực vật được thực hiện theo 1 chương trình xác định trong thông tin di truyền đặc trưng cho loài.

Tế bào thực vật khác xa với tế bào động vật và vi sinh vật:

1.1. Tế bào thực vật là một tế bào hữu nhân điển hình:

Tế bào thực vật có cellulose bao bọc bên ngoài màng nguyên sinh. cellulose của các tế bào thực vật liên kết nhau bằng peclin và các dẫn xuất cellulose khác.

Vai trò của cellulose ở chỗ bảo vệ và giúp cho thực vật đứng thẳng mà còn giúp cho toàn bộ quá trình trao đổi chất.

Nêu xử lý mô thực vật bằng enzym peclinaza và cellulosa, phần lớn peclin và cellulosa bị phân hủy, các tế bào thực vật trần không có vỏ cellulosa bao bọc được giải phóng ra môi trường được gọi là protoplast. Protoplast có thể được nuôi sống và tái tạo lại thành tế bào, mô hay cây hoàn chỉnh. Trong bất kì môi trường nào hoạt động sống của photoplasme cũng bắt đầu việc tái tạo lại cellulosa và khi vỏ cellulosa đã được tái tạo thì tế bào mới được phân chia và tiếp tục phát triển.

Qua vỏ cellulosa, các muối khoáng và nước có thể trao đổi dễ dàng, tuy vậy đối với các đại phân tử như protein, nucleic axit thì vỏ cellulosa cũng thể hiện 1 sự ngăn cách nhất định. DNA có thể xâm nhập tế bào qua cả vỏ cellulosa lẫn màng nguyên sinh.

Vỏ cellulosa được hình thành không chỉ khi nằm trên cây hoàn chỉnh mà khi nuôi chúng riêng rẽ dưới dạng các tế bào đơn và trong trường hợp này nó mang hình thái rất đa dạng.

Khi đã mất hẳn vỏ bọc cellulosa, các protoplast luôn ở dạng tròn

Lạp thể: bào quan đặc biệt của tế bào thực vật (tuy tế bào thực vật xanh)

Lục lạp: lục chứa và diệp lục (diệp lục là chất màu xanh lục)

Bào quan: còn gọi cơ quan tử. Tế bào chất của tất cả tế bào nhân thực chứa một số cấu trúc có màng bao bọc, đảm nhiệm các chức năng chuyên hóa. Những cấu trúc này được gọi là bào quan.

Ti thể: Bào quan của các tế bào nhân thật, có kích thước tương tự tế bào vi khuẩn mỗi tế bào có hơn 1.000 ti thể.

1.2. Tế bào thực vật có các lục thể đặc biệt là các lục lạp:

Lục lạp có cấu trúc phân tử phức tạp, chứa toàn bộ diệp lục và làm nhiệm vụ quang hợp. Lục lạp chứa bộ máy di truyền riêng của chúng trong một môi trường quan hệ chặt với bộ máy di truyền của nhân bào. Một số khả năng chống chịu ở thực vật có liên quan đến các gen nằm trong lục lạp nhiều hơn các gen nằm trong nhân hoặc ti thể.

Bình quân mỗi tế bào thực vật có thể chứa khoảng 50 lục lạp. Bằng các phương pháp công nghệ gen hiện đại, có thể chuyển lục lạp và bộ máy di truyền của lục lạp từ tế bào cây này sang tế bào loài cây khác và giúp cây mang tính trạng di truyền mới. Các nguyên nhân theo hướng này đã hình thành ngành công nghệ cơ quan tử (plastid engineering) là nhánh quan trọng của CNSH thực vật ngày hôm nay.

1.3. Tế bào thực vật có tính toàn thể:

Khả năng toàn thể được hiểu là khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh từ mô hoặc tế bào đơn, thậm chí từ protoplast thực vật. Các tế bào động vật hoàn toàn không có khả năng này.

Khả năng phát sinh hình thái của tế bào thực vật là vấn đề quan trọng có tính chất quyết định đối với các ứng dụng công nghệ gen trong chọn tạo giống mới ở thực vật. Nếu sau khi chuyển gen, tế bào hoặc mô mất khả năng tái sinh, thì việc chuyển gen coi như có ý nghĩa thực tế.

Khả năng tái sinh cũng có thể hiện là sự kích hóa. Khi mới cấy mô thực vật trong điều kiện kích thích nhân tạo để tạo nên mô sẹo, ta đã thực hiện quá trình phân biệt hóa: Khi ngừng các tác động kích thích mô thực vật có khuynh hướng tự biệt hóa trở lại thành các mô có chức năng như rễ, thân, lá...

Cuối những năm 60 đã chứng minh đầy đủ tính toàn thể của thực vật bậc cao, đồng thời đã chứng minh là mỗi tế bào thực vật đều chứa đầy đủ các thông tin di truyền của toàn bộ cơ thể.

Từ đó đến nay, khoa học cấy mô thực vật đã tiến những bước dài sự phát sinh hình thái, hoặc khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh từ 1 tế bào, một mảnh lá, một khối mô sẹo... đã được thực hiện trên hàng trăm loài thực vật, tập trung vào hầu hết các cây trồng quan trọng.

1.4. Tế bào thực vật có bộ máy di truyền phức tạp:

Các hiểu biết về di truyền phân tử ở vi sinh vật không đủ để lý giải nhiều hiện tượng di truyền ở thực vật bậc cao. Tế bào thực vật bậc cao chứa 1 lượng DNA lớn gấp nhiều lần ở vi khuẩn và nhiều trường hợp còn gấp bội so với lượng DNA ở tế bào người.

DNA thực vật khác với DNA vi sinh vật, phát hiện các dãy mã lặp đi lặp lại nhiều lần. Các gen di truyền được phân cách nhau bằng các đoạn DNA không mã hóa được gọi là introns.

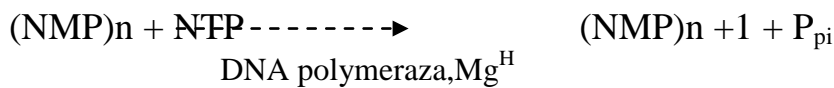
Các nhóm gen ở thực vật cũng không nằm cố định trên các thể nhiễm sắc. Một số cơ thể nhảy qua lại trong quá trình của thực vật và chúng được gọi tên là gen nhảy (jumping gen)

Tóm lại sự phức tạp của bộ máy di truyền làm cho việc ứng dụng CNSH để giải quyết các mục tiêu không dễ dàng.

1.5. Sự thể hiện của gen trong sao chép và dịch mã:

1.5.1. Đọc mã :

Là quá trình tạo ra các phân tử RNA thông tin (messenger RNA) theo khuôn mẫu trên DNA, do enzym RNA polymerase xúc tác.



(NMP)_n là đoạn RNA có sẵn gồm n nucleotide monophotphat NTP các nucleotit triphotphat (nucleotide)

RNA polymeraza có khả năng nhận biết các điểm khởi đầu cho đọc mã trên chuỗi DNA

Ở vi khuẩn các điểm này là các dãy mã TATA, còn gọi là “hộp TATA”, hộp TATA ở thực vật phức tạp hơn, được mã bằng nhiều nucleotit hơn, đa dạng hơn (vẫn gọi chung là hộp TATA), ví dụ :

T - - - TATA - - - 1 - 3 - - - A

1 - 3 : là số lần nhắc lại có thể có của ademin

Ngoài hộp TATA, ở thực vật còn có hộp CAAT nằm ở phía thượng lưu của hộp TATA, hộp CAAT có nhiệm vụ điều hòa mức độ đọc mã.

1. RNA polymeraza I đọc mã cho sinh tổng hợp RNA ribosome (rRNA), chúng chỉ hoạt động bên trong nhân bào.

2. RNA polymeraza II đọc mã cho sinh tổng hợp mRNA, hoạt động chủ yếu ở bên ngoài nhân bào

3. RNA polymeraza III đọc mã cho sinh tổng hợp RNA ngắn như RNA vận chuyển (tRNA) hoặc hoặc tRNA 5S

Mỗi tế bào thực vật chứa đến vài triệu ribosome, vì vậy ở các mô thực vật đang tăng trưởng mạnh đều có hoạt động sinh tổng hợp rRNA rất cao. Ở đây sản phẩm hoạt động của RNA polymeraza chưa tạo ngay ra các RNA hoàn chỉnh mà chỉ tạo ra các tiền chất của chúng. Các tiền chất này còn phải qua “cắt gọt” bằng metyl hóa còn lại kích thước cỡ 3000 – 3500 nucleotit mới kết hợp với protein và tạo nên ribosome.

Mỗi mRNA khác nhau, tương ứng với khoảng 100.000 gen. Mỗi mRNA đều có một dãy mã để tổng hợp protein, ngoài ra còn có thêm các dãy mã nằm ở 2 đầu để làm nhiệm vụ điều khiển quá trình dịch mã. Đầu 5' của mRNA có một dãy mã ngắn gọi là mũ ở đầu 5' (5' cap). Mũ này thường là một gốc qua nosine), được chụp lên đầu 5' của phân tử mRNA ngay sau khi RNA polymeraza II kết thúc quá trình đọc mã. Mã có nhiệm vụ bảo vệ mRNA hoặc ra lệnh cho quá trình tổng hợp protein khởi sự.

Đầu 3' của mRNA thường là 1 dãy mã độ 200 nucleotit toàn là gốc ademosinem gọi tên là đuôi poly A. Cũng như mã 5', đuôi poly A được gắn vào mRNA ngay sau khi đọc mã, bằng E poly (A) polymerase.

1.5.2. Dịch mã:

Là quá trình sinh tổng hợp các phân tử protein căn cứ vào dãy mã trên phân tử mRNA. Như thể sự thể hiện gen có thể chia ra 2 mức, mức đọc và mức dịch.

Để thấy rõ mức độ phức tạp của sự thể hiện một gen trong 100.000 gen của cây, hãy xem xét cấu trúc của gen mã hóa cho E polygalaclorunaza ở cà chua và sản phẩm thể hiện ở gen này.

Trên gen mã hóa cho polygalaclorunaza có 8 dãy số. Kích thước từ 99 đến 953 nucleotit. Hộp CAAT nằm ở nucleotit-31, thượng nguồn của tín hiệu bắt đầu đọc ATG. Quá trình đọc và dịch cho ra hai đoạn peptit 71 và 356 a.amin. Cuối cùng peptit 79 a.amin bị loại và hình thành phân tử E polygalaclorunaza có 356 a.amin

Hiện tượng các dãy mã đọc xen lẫn với các dãy mã mù rất phổ biến trong cấu tạo các gen thực vật.

Chú ý chỉ 1 phần rất nhỏ DNA thực vật được biểu hiện thông qua đọc và dịch thành các phân tử protein.

Các nghiên cứu mới đây cho thấy sự bảo thủ của tính di truyền ở thực vật chỉ là tương đối. Ngoại cảnh có thể ảnh hưởng đến tính di truyền một cách nhanh chóng, không cần hàng triệu năm tiến hóa và các ảnh hưởng này được di truyền qua các đời sau. Do ảnh hưởng bên ngoài, bộ máy di truyền thực vật có thể bị thay đổi do :

Sự xâm nhập của DNA ngoại lai (VK, virus)

Sự chuyển dịch các gen từ vị trí này qua các vị trí khác.

Sự chuyển dịch DNA từ lục lạp và ti thể vào nhân bào

Sự tồn tại của các gen nhảy (jumping gens) là nét đặc trưng, thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác hoặc ở các vị trí khác nhau trên cùng 1 thể nhiễm sắc. Chúng có thể nhảy vào giữa dãy mã của 1 gen đang hoạt động làm cho gen này bất hoạt hoặc ngược lại.

1.6. Tính bảo thủ của gen về di truyền và biến dị:

Hiện tượng di truyền và biến dị là 2 mặt mâu thuẫn thống nhất của sự sống, nhờ đó sự tiến hóa có thể thực hiện. Bản chất của 2 hiện tượng này có liên quan chặt chẽ với sự hình thành tồn tại axit deoxyribonucleic (DNA) . Vì vậy DNA là phân tử của sự sống, sợi chỉ của sự sống, chuỗi xoắn kép của sự sống. Cơ chế sinh tổng hợp DNA, vai trò khuôn mẫu của DNA trong tổng hợp protein (enzim) thông qua các phân tử axit ribonucleic (RNA) dần dần đã được khám phá để lí giải hiện tượng di truyền và biến dị, các p/p CN gen, hầu hết là các p/p xử lý DNA hoặc RNA.

Di truyền và biến dị nằm trong sự thể hiện của gen trong quá trình phát triển của sinh vật. Ngày nay gen đã được đo đạc, chụp ảnh và xác định chính xác ở mức phân tử , là 1 hay nhiều đoạn DNA tương ứng với 1 tính trạng.

Cơ chế sinh tổng hợp DNA theo khuôn mẫu đảm bảo tính bảo thủ của hiện tượng di truyền qua các thế hệ. Những thay đổi dù nhỏ, trên đoạn DNA tương ứng với 1 gen, ít nhiều cũng dẫn đến sự thay đổi tính trạng, cơ sở của hiện tượng biến dị.

PHẦN II: CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT BẬC CAO

I. Xác định và dòng hóa gen:

1.1. Chiết suất và tinh sạch DNA từ mô thực vật:

Có rất nhiều phương pháp tùy theo mục đích sử dụng DNA để làm gì hoặc chiết xuất loại mô nào. Khuynh hướng chung hiện nay là tìm phương pháp đơn giản nhất, thời gian thao tác ngắn nhất nhưng DNA thu được vẫn có đủ độ tinh khiết và độ nguyên vẹn 50 – 100 KG cần thiết cho các thao tác tiếp theo trong công nghệ gen thực vật như cắt bằng E giới hạn, chạy phản ứng PCR Muốn thu DNA có chiều dài 100 – 5.000 KG phải dùng phương pháp điện di có điện trường không liên tục

*Chiết suất và tinh sạch DNA tổng số

Tế bào thực vật được nghiền vỡ trong điều kiện lạnh làm cho DNA được hòa vào đệm chiết SDS (sodium dedecyl sulfat) hoặc CTAB (celytrimethyl amonium bromide) được thêm vào để giúp DNA hòa dễ hơn, đầy đủ hơn vào dịch đệm. EDTA có tác dụng gắn chặt

các ion Mg^{+} là yếu tố cần cho sự hoạt động của nucleotit phân huỷ DNA trong quá trình chiết. Protein được tách khỏi DNA bằng phenol hoặc chloroform

Chiết suất DNA từ mô thực vật

Lá nghiền với đệm chiết CATB có chứa mercabthoethanol. DNA được chiết bằng hỗn hợp chloroform izoamila, kết tủa bằng izphopanól, sau đó qua 1 số bước để rửa và tinh khiết DNA.

Chiết xuất DNA thực vật để chạy PCR

Mẫu lá được sử dụng ở lượng rất ít. Quá trình chiết được đơn giản hóa nhiều để thao tác nhanh và làm cùng 1 lúc nhiều mẫu, tuy vậy DNA được chiết ra hoàn toàn đủ độ lớn và độ sạch để chạy PCR tiếp theo.

1.2 Cắt DNA bằng Enzim giới hạn:

* Các enzim giới hạn:

Enzim giới hạn là nhóm endonucleoaza chỉ cắt phân tử DNA ở những vị trí có dãy mã nucleotit nhất định mà chúng có khả năng nhận ra. Thuộc tính rất quan trọng này của enzim giới hạn cho phép cắt phân tử DNA ở các vị trí chọn sẵn. Mỗi enzim giới hạn hoạt động tối thích trong các điều kiện khác nhau.

Ứng dụng chủ yếu của melynaza là để bảo vệ 1 số vị trí trên DNA mà người ta không muốn bị cắt bởi enzim giới hạn.

1.3 Điện di DNA và các sản phẩm cắt DNA trên gel agarose:

Các đoạn DNA được cắt từ phân tử DNA có khối lượng khác nhau và diện tích khác nhau được tách ra khi di chuyển từ cực âm sang cực dương của máy điện di trong 1 điện trường có điện thế và cường độ thích hợp.

1.4 Nối các đoạn bằng DNA ligase:

DNA ligase là các enzim nối đoạn DNA lại với nhau. Điểm nối lại là đầu 3' của một đoạn DNA và đầu 5' của đoạn còn lại. Năng lượng để nối là A_{TP}

Ứng dụng quan trọng nhất của ligase là trong cấu trúc của các vector plasmid và các cấu trúc DNA khác đã có đủ các dãy mã cần thiết cho việc chuyển gen, biểu hiện gen, sàng lọc các tế bào đã chuyển gen.

1.5. Dòng hóa gen:

Dãy mã tự nucleotit của gen thường được biết thông qua tìm hiểu dãy mã tự axit amin của sản phẩm của nó, các protein. Sau khi chiết xuất, tinh sạch protein để giải mã, dãy mã tự axit amin của chúng

***Nhân dòng gen:**

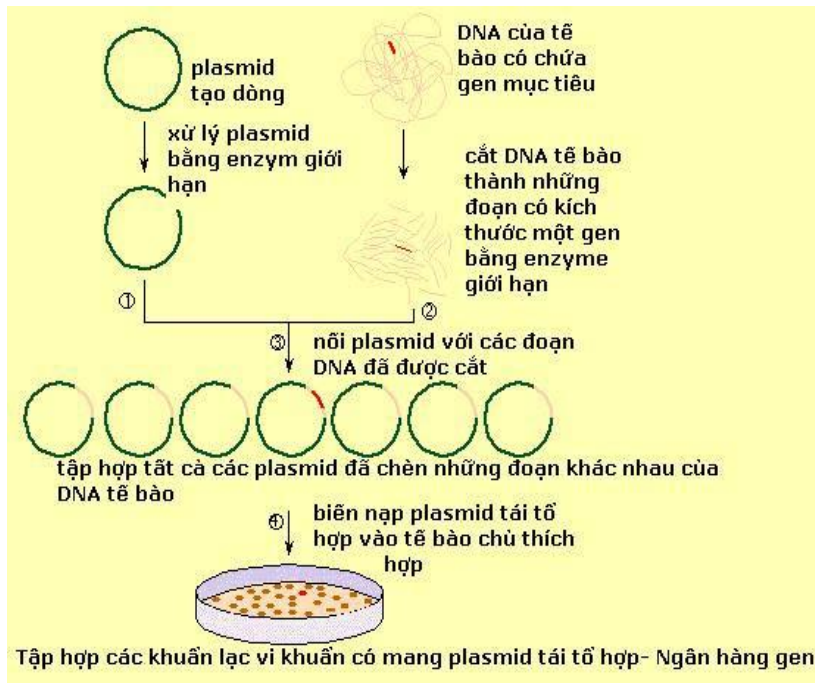
Nhân dòng gen là một tiến trình trong đó gen mục tiêu được định vị và nhân lên từ DNA được tách chiết từ một cá thể.

Khi tách chiết DNA khỏi một cá thể thì tất cả gen của nó cũng được tách ra khỏi cá thể. DNA này chứa đến hàng ngàn gen khác nhau nên nhà di truyền học phải tìm ra gen

Ngân hàng gen:

Bởi vì không thể định vị gen trên DNA bằng mắt thường, các nhà khoa học phải tạo ngân hàng gen.

Ngân hàng gen là một tập hợp khuẩn lạc vi khuẩn sống có mang nhiều đoạn của DNA từ một cá thể. Đây chính là nguồn của gen mục tiêu.



Hình 2.1 Quy trình xây dựng ngân hàng gen

Xây dựng ngân hàng gen

Xây dựng ngân hàng gen cần DNA tách chiết, enzyme cắt giới hạn và plasmid.

Bước 1: DNA tách chiết từ cá thể có chứa gen mục tiêu được cắt bởi enzyme giới hạn thành nhiều mảnh có kích thước của một gen.

Bước 2: plasmid của vi khuẩn cũng được xử lý bởi cùng enzyme giới hạn.

Bước 3: DNA có kích thước một gen và plasmid đã được xử lý được trộn chung với nhau trong một tube. Một số các đoạn DNA đã được cắt bằng enzyme sẽ nối với plasmid và tạo thành plasmid tái tổ hợp.

Bước 4: plasmid tái tổ hợp sau đó được chuyển vào tế bào vi khuẩn bằng điện biến nạp hoặc hoá biến nạp.

Bước 5: vi khuẩn tăng trưởng trên đĩa môi trường và cho phép hình thành khuẩn lạc. Tất cả khuẩn lạc trên đĩa môi trường được gọi là ngân hàng gen.

Bước 6: ngân hàng gen được sàng lọc để tìm ra khuẩn lạc nào có chứa gen mục tiêu bằng cách phát hiện trình tự DNA của gen mục tiêu hay một protein mà gen đó mã hoá hay sử dụng mẫu dò. Vì vậy, trước khi sàng lọc ngân hàng gen, nhà khoa học phải biết được trình tự của gen mục tiêu hay gen gần giống nó nhất hay protein mà gen đó mã hoá hoặc một mẫu dò được thiết kế cho gen đó. Khi vi khuẩn được nhân lên sẽ tạo nhiều DNA tái tổ hợp dẫn đến số lượng bản sao của gen cũng tăng lên, nhờ đó việc phát hiện gen hay protein dễ dàng hơn.

Sau khi xác định được khuẩn lạc có chứa gen mục tiêu, vi khuẩn có thể được nhân dòng để tạo hàng triệu bản sao của plasmid tái tổ hợp có chứa gen đó.

II. Các kỹ thuật chuyển gen:

Thông tin di truyền acid deoxyribonucleic (DNA) tồn tại ở 3 dạng chính:

- DNA của cơ thể bậc cao trong đó có DNA nhân và DNA cơ quan tử.
- DNA của vi sinh vật.
- DNA của plasmid.

Biến nạp thông tin di truyền (chuyển gen) là kỹ thuật sử dụng DNA tinh khiết để đưa vào cơ thể hay tế bào khác và theo dõi biểu hiện của thông tin di truyền mới này.

Để biến nạp hiệu quả nguyên liệu di truyền vào tế bào vật chủ, các cấu trúc di truyền cần được thiết kế thích hợp cho sự hợp nhất và biểu hiện của các gen ngoại lai. Cấu trúc di truyền phải mang một gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker gen: gen mã hóa một protein khử độc của hóa chất bổ sung trong môi trường nuôi cấy, cho phép sinh trưởng ưu tiên của các tế bào có DNA ngoại lai được hợp nhất) hoặc sàng lọc (screenable marker gen: gen mã hóa một protein cho kết quả trong sản phẩm sống sót nhờ đó có thể xác định tế bào biến nạp thể hiện gen) để nhận biết hiệu quả biến nạp gen.

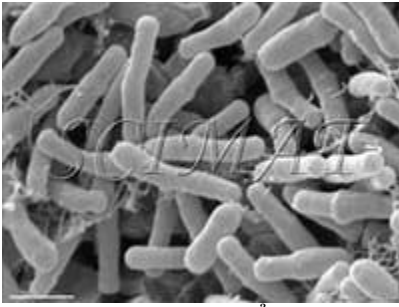
Một cấu trúc di truyền đặc trưng bao gồm: gen khởi đầu (promoter), gen mã hóa (coding gen) và gen kết thúc (terminator). Các gen mã hóa có thể được đưa vào mô thực vật nhờ vào các vector plasmid. Hai promoter chủ yếu thường được sử dụng cho biến nạp gen ở thực vật là: promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus) thích hợp cho sự biểu hiện của DNA ngoại lai ở cây hai lá mầm và promoter ubiquitin của ngô thích hợp cho sự biểu hiện mạnh của DNA ngoại lai ở cây một lá mầm.

Các mẫu vật (các bộ phận của cây hoặc mô dùng để biến nạp) thích hợp nhất cho biến nạp gen là những mẫu vật đòi hỏi thời gian nuôi cấy trước và sau khi biến nạp ngắn nhất. Nhiều nghiên cứu cho thấy thời gian kéo dài của mô nuôi cấy thường tạo ra các đột biến di truyền làm mất khả năng tái sinh của các cây được biến nạp gen. Các mẫu vật được sử dụng trong chuyển gen thường là: protoplast, phôi non hoặc callus có nguồn gốc từ hạt (lúa mì), các mô nuôi cấy phát sinh cụm chồi, và trụ phôi (có nguồn gốc từ các hạt non hoặc hạt già) dùng để biến nạp trực tiếp DNA ngoại lai vào mô phân sinh ở cây hai lá mầm (legumes, bông...). Trong một số trường hợp, biến nạp thông qua nuôi cấy phát sinh phôi (embryogenic culture) cũng có thể thực hiện được, chẳng hạn ở các loài tùng bách, các loài cây ăn quả và một số loài khác.

Công nghệ chuyển gen (biến nạp gen) thực hiện việc chuyển các gen ngoại lai vào tế bào và mô thực vật. Có nhiều phương pháp chuyển gen khác nhau ở thực vật, nhưng ở đây chỉ trình bày một số phương pháp chủ yếu:

II.1. Agrobacterium:

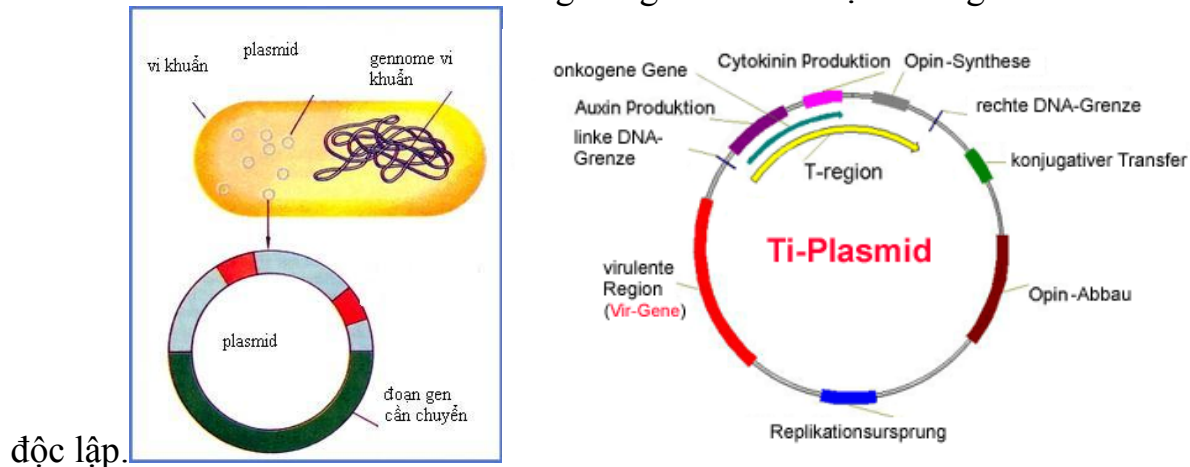
Agrobacterium tumefaciens và *Agrobacterium rhizogenes* là hai loài vi khuẩn gây bệnh cho thực vật được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai vào mô và tế bào thực vật. *A. tumefaciens* có chứa một plasmid lớn kích thước khoảng 200 kb gọi là Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) chính là tác nhân truyền bệnh cho cây. Khi cây bị nhiễm *A. tumefaciens* qua các vết thương, biểu hiện bệnh rõ nhất là các khối u được hình thành ở ngay chỗ lây nhiễm. Sự hình thành khối u sau đó có thể tiếp tục mà không cần thiết phải có sự hiện diện của vi khuẩn. Khả năng này có được do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid (T-DNA) xâm nhập vào hệ gen của cây bị bệnh.



Hình 2.2. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

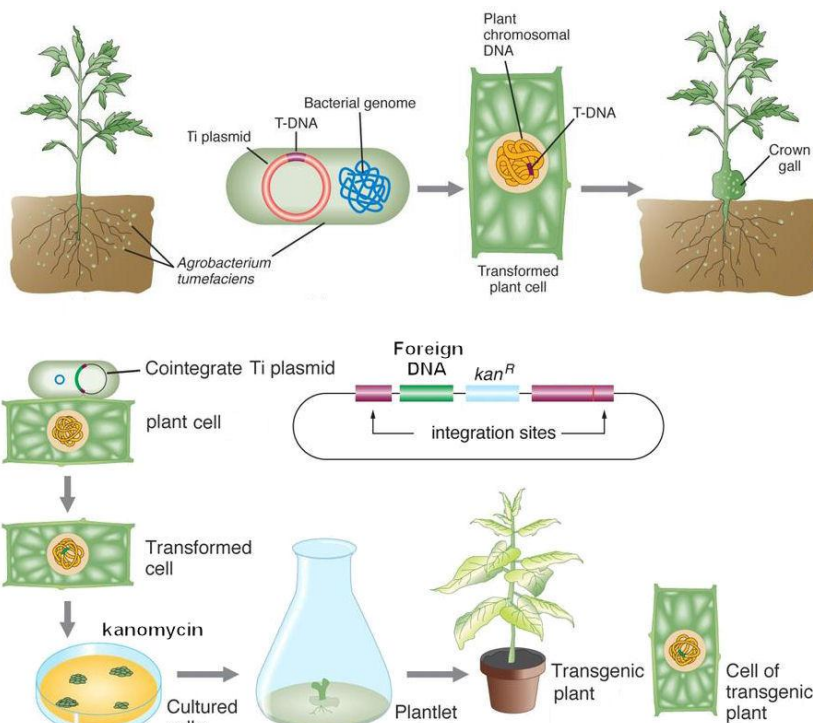
II.2. *Ti-Plasmid*:

Trong thế giới động-thực vật đều tồn tại các thể plasmid, đó là các vòng DNA tự sinh sản độc lập. Ở vi khuẩn và động-thực vật, plasmid liên quan tới yếu tố giới tính của tế bào, đến khả năng chống chịu các loại kháng sinh... Đặc điểm quan trọng của plasmid là chúng có thể liên kết vào nhiễm sắc thể nhưng cũng có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể một cách



Hình 2.3. *Ti-Plasmid*

Các plasmid của *Agrobacterium* được sử dụng vào công nghệ gen thực vật ở hai dạng vector cis và trans. Đây là hai dạng vector rất thuận lợi để tái tổ hợp gen ngoại lai và chuyển vào tế bào thực vật. Dạng cis chỉ sử dụng *Ti-plasmid* và tế bào vật chủ là *Agrobacterium tumefaciens* mà không có sự tham gia của plasmid và vi khuẩn khác. Vùng T-DNA của *Ti-plasmid* được thiết kế lại để gắn những gen ngoại lai mong muốn, các phần còn lại của *Ti-plasmid* vẫn được giữ nguyên. *Agrobacterium tumefaciens* được dùng làm tế bào vật chủ để nhân lên nhiều bản sao của *Ti-plasmid* và chuyển gen. Dạng trans hay binary là dạng sử dụng hai hay nhiều loại plasmid và vi khuẩn cùng lúc. Trước tiên, plasmid của *E. coli* chứa đoạn T-DNA được giới hạn bởi bờ phải (right border-RB) và bờ trái (left border-LB) mang gen ngoại lai (gen đích) được thiết kế và nhân lên trong vi khuẩn *E. coli*. Tiếp đến plasmid mang gen ngoại lai được chuyển nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* nhờ một helper plasmid (quá trình triparental mating). Vi khuẩn *Agrobacterium* đã mang sẵn một loại plasmid khác chứa vùng vir (virulence region) có chức năng quan trọng trong quá trình chuyển gen ngoại lai. Sự tồn tại song song hai plasmid này đã tương tác lẫn nhau trong việc chuyển gen vào tế bào thực vật. Như vậy, gen ngoại lai và vùng DNA giúp quá trình chuyển gen (vùng vir) không nằm trên cùng một plasmid nên hệ chuyển gen này được gọi là hệ trans.



Hình 2.4. Quy trình chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*

II.3. T-DNA:

T-DNA được nghiên cứu rất kỹ. Đó là một đoạn DNA có kích thước 25 kb trong đó chứa gen mã hóa cho sinh tổng hợp auxin, cytokinin, opine và các gen gây khối u (oncogenes). Trong Ti-plasmid, vị trí của T-DNA được giới hạn bằng RB và LB. Ngoài T-DNA, trên Ti-plasmid còn có các vùng DNA mã hóa cho việc tái sinh plasmid (replication), cho khả năng lây nhiễm và tiếp hợp (vùng vir), cho việc tiêu hóa opine (opine catabolism)

Trong các vùng DNA của Ti-plasmid, ngoài T-DNA, được nghiên cứu nhiều hơn cả là vùng DNA phụ trách khả năng lây nhiễm còn gọi là vùng vir. Sản phẩm hoạt động của các gen nằm trong vùng vir dưới tác động kích thích của các hợp chất phenol tiết ra từ vết thương là một loạt các protein đặc hiệu như virE2, virB, virD, virD2, virC1... Các protein này nhận biết các vết thương ở các cây chủ thích hợp (hầu hết là cây hai lá mầm), kích thích sản sinh ra các đoạn T-DNA, bao bọc che chở các đoạn DNA này và giúp chúng tiếp cận với hệ gen của cây chủ một cách an toàn.

Khi cây nhiễm *A. tumefaciens*, do T-DNA nạp vào trong hệ gen của cây chủ bắt đầu hoạt động và sản sinh ra auxin, cytokinin và opine, toàn bộ sinh trưởng của cây bị rối loạn, các tế bào phân chia vô tổ chức và tạo ra các khối u. Opine được vi khuẩn sử dụng như một loại “thức ăn”. Nhờ gen chuyển hóa opine trên Ti-plasmid. Cơ chế lây nhiễm của *A. rhizogenes* đối với cây hai lá mầm cũng tương tự, nhưng trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản sinh ra auxin, vì thế sự thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rất nhiều rễ tơ (hairy roots) khi bị nhiễm bệnh.

Trên thực tế bệnh cây, *Agrobacterium* chỉ gây hại ở cây hai lá mầm, vì vậy người ta cho rằng chúng chỉ có thể đưa T-DNA vào hệ gen các cây hai lá mầm. Gần đây, nhiều tác giả đã chứng minh khi nhiễm vi khuẩn, các cây một lá mầm cũng có thể sản xuất opine và có thể khai thác khả năng biến nạp gen của *Agrobacterium* vào cây một lá mầm.

II.4. Chuyển DNA ngoại lai vào tế bào và mô thực vật nhờ *Agrobacterium tumefaciens*:

Cơ chế gây bệnh của các *Agrobacterium* là sau khi xâm nhiễm vào tế bào, chúng gắn đoạn T-DNA vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật, dẫn đến sự rối loạn các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra khối u (trường hợp *A. tumefaciens*) hoặc rễ tơ (trường hợp *A. rhizogenes*). Khả năng chuyển gen này đã được khai thác để chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

Để gắn T-DNA vào tế bào thực vật, đầu tiên vi khuẩn *A. tumefaciens* phải tiếp xúc với thành tế bào thực vật bị tổn thương. Quá trình này được thực hiện nhờ các gen *chvA* và *chvB*. Gen *chvB* mã hoá một protein liên quan đến hình thành β -1,2 glucan mạch vòng, trong khi đó gen *chvA* xác định một protein vận chuyển, định vị ở màng trong của tế bào vi khuẩn. Protein vận chuyển giúp vận chuyển β -1,2 glucan vào khoảng giữa thành tế bào và màng sinh chất. β -1,2 glucan giữ vai trò quan trọng để vi khuẩn *Agrobacterium* tiếp xúc với thành tế bào thực vật. Nếu không có sự tiếp xúc này, sẽ không có sự dẫn truyền T-DNA.

Các sản phẩm protein của vùng vir có tác dụng cho việc dẫn truyền T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Các loại protein đó rất cần thiết cho quá trình cắt T-DNA khỏi Ti-plasmid, cảm ứng thay đổi màng tế bào thực vật mà chúng tiếp xúc, tham gia di chuyển phần T-DNA qua màng vi khuẩn tới tế bào chất của tế bào thực vật, vận chuyển tới nhân rồi cuối cùng xâm nhập vào genome của cây chủ.

Thực chất chỉ riêng T-DNA của Ti-plasmid được chuyển vào genome tế bào thực vật, mà không còn phần nào khác. Quá trình dẫn truyền chỉ do sản phẩm của các gen vir (vùng vir) và gen *chv* quyết định mà không liên quan đến các gen khác trên T-DNA. Tuy nhiên, chuỗi DNA 25 bp (RB và LB của T-DNA) có vai trò là vị trí cảm ứng cho các sản phẩm của tổ hợp các gen vùng vir, đặc biệt là protein từ gen *virE* mang chúng dẫn truyền vào tế bào thực vật. Chúng hoạt động như các tín hiệu nhận biết và khởi động quá trình dẫn truyền. Trước hết gen *virA* trong tổ hợp gen vùng vir được phosphoryl hoá nhờ tác động của các hợp chất phenol như acetosyringone giải phóng ra từ các tế bào thực vật tổn thương. Sản phẩm của quá trình này lại tiếp tục phosphoryl hóa gen *virG*. Sản phẩm của gen *virG* liên tiếp làm hoạt hóa toàn bộ các gen vir còn lại, mà hai gen cuối cùng được hoạt hóa là gen *virB* và *virE*. Trước đó, khi gen *virD* được hoạt hóa, sản phẩm của nó cảm ứng nhận biết RB và LB của T-DNA và làm đứt phần T-DNA ra khỏi DNA của Ti-plasmid thành các sợi đơn. Đồng thời quá trình phosphoryl hóa này cũng làm thay đổi thẩm xuất màng tế bào thực vật, màng tế bào bị mềm ra và bị thủng. Các sợi đơn T-DNA được gắn vào protein do gen *virE* tổng hợp và dịch chuyển về phía màng tế bào vi khuẩn. Ngay sau đó, sợi T-DNA được trượt từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Cầu nối chính là sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào do cảm ứng sản phẩm gen *virB* mà thành. Khi T-DNA đã được chuyển giao vào tế bào thực vật, chúng nhanh chóng xâm nhập vào genome tế bào thực vật (integration) được ổn định và di truyền như các gen bình thường khác.

II.5. Các gen chỉ thị chọn lọc và gen chỉ thị sàng lọc:

Các gen chỉ thị chọn lọc chung nhất mã hóa các protein khử độc các nhân tố ức chế trao đổi chất như các kháng sinh hoặc chất diệt cỏ (herbicide). Các gen chỉ thị sàng lọc thường được sử dụng là các gen β -glucuronidase (gusA), luciferase và gần đây hơn là gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescent) của sứa.

Bằng các phương pháp sinh học phân tử có thể tạo ra các cấu trúc DNA plasmid, trong đó ngoài các gen khởi động (promoter gene), các gen của vi khuẩn *Agrobacterium* giúp cho DNA plasmid gắn được vào bộ gen thực vật, gen ngoại lai cần chuyển vào... còn có các gen giúp phân lập ra tế bào hoặc mô thí nghiệm. Các gen được lắp ghép vào DNA plasmid với mục đích này được gọi là gen chỉ thị chọn lọc hay gen chỉ thị sàng lọc.

Gen chỉ thị chọn lọc thường dùng nhất là các gen mã hóa cho một số enzyme chỉ có trong vi khuẩn ở điều kiện tự nhiên mà không có trong giới thực vật. Sau khi chuyển gen, nếu thấy enzyme vi khuẩn hoạt động thì có thể suy ra là toàn bộ DNA plasmid đã được gắn vào bộ gen của thực vật và gen ngoại lai mà ta cần chuyển đã trở thành một bộ phận của bộ máy di truyền thực vật.

Các gen chỉ thị thường dùng nhất là các gen gus A (β -glucuronidase), gen npt II (neomycin phosphotransferase), gen lux (luciferase), gen cat (chloramphenicol acetyltransferase), gen nos (nopaline synthase)

Gen npt II. Enzyme neomycin phosphotransferase (npt II) là một enzyme vi sinh vật có trọng lượng phân tử khoảng 25 kD, xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa một số kháng sinh gốc aminoglycoside như neomycin, kanamycin và G148. Trong phản ứng này, nhóm γ phosphate của ATP được gắn vào phân tử chất kháng sinh làm nó trở nên bất hoạt do ngăn trở sự liên kết của kháng sinh với ribosome.

Gen bar. Gen bar là tên gọi của gen mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT), có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), là hoạt chất chính của thuốc trừ cỏ như Bialaphos và Basta. Gen bar được tạo dòng đầu tiên từ một dòng vi khuẩn *Streptomyces hygrosopicus*. Phương pháp đơn giản nhất để kiểm tra sự có mặt của gen bar là phương pháp trực tiếp. Mô, tế bào hoặc cây chuyển gen được đặt trên môi trường có các nồng độ phosphinothricin khác nhau (hoặc các thuốc trừ cỏ tương ứng) và so sánh sinh trưởng của mô, tế bào hoặc cây đối chứng đặt trên cùng môi trường.

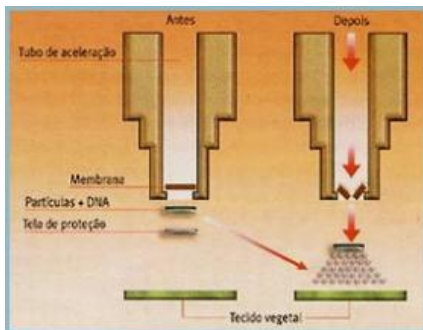
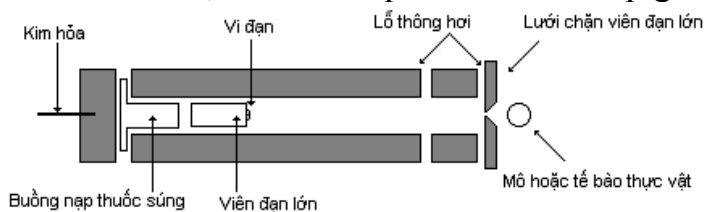
Gen gus A. là gen mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme β -glucuronidase. β -glucuronidase là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải các β -glucuronide, sản phẩm phân giải có màu xanh chàm đặc trưng, dễ nhận biết. β -glucuronide thường dùng nhất trong phản ứng để nhận biết sự tồn tại của gen gus A là X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). Dung dịch X-Gluc không màu dưới tác động của enzyme β -glucuronidase sẽ chuyển sang màu xanh chàm rất đặc trưng.

Gen lacZ. Enzyme β -galactosidase (lacZ) trọng lượng phân tử 116 kD, pH tối thích 7-7,5 được mã hóa do gen lacZ. Gen lacZ ở *E. coli* được dùng rất phổ biến trong công nghệ gen vi sinh và đã có sẵn các hệ thống phương pháp kiểm tra rất nhạy với thuốc thử X-Gal. Sự tồn tại hoạt động của lacZ trong tế bào thực vật đã được khẳng định. Vì vậy trước khi kiểm tra sự có mặt của gen lacZ ngoại lai, cần phải bất hoạt gen lacZ nội sinh bằng glutaraldehyde.

Gen cat. Được phân lập và tạo dòng từ dòng vi khuẩn Tn9, là gen gây khả năng kháng chloramphenicol ở vi khuẩn nói chung. Gen cat đã được dùng rộng rãi trong công nghệ gen động vật và thực vật vì gen cat mã hóa cho enzyme chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Enzyme này xúc tác phản ứng acetyl hóa hai vị trí trên phân tử chloramphenicol và làm nó bất hoạt.

Đây là phương pháp hiện đang được sử dụng phổ biến tại các phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật ở trong nước và trên thế giới. Nguyên tắc của phương pháp này là sử dụng các viên đạn có kích thước hiển vi, có tỷ trọng cao để đạt gia tốc cao xuyên qua vỏ và màng tế bào, đưa lớp DNA bọc ngoài tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào.

Hạt tungsten hoặc vàng có đường kính 1-1,5 μm được dùng làm vi đạn (microprojectile). Vi đạn được trộn với DNA theo một tỷ lệ thích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh vi đạn, hỗn hợp được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng kích thước 0,5-0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) vừa khít với nòng súng. Thường đạn lớn làm bằng nhựa hoặc bông nén hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn, áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Ra khỏi đầu nòng, một lưới thép mịn cản viên đạn lớn lại, nhưng các vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình biến nạp gen



Hình 2.5. Sơ đồ súng bắn gen.

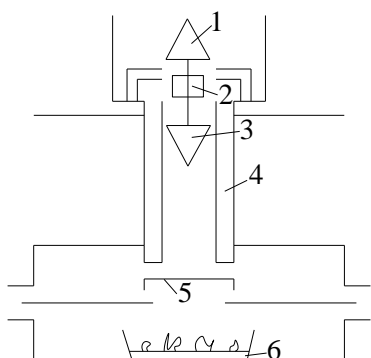
*Làm viên đạn.

Viên đạn được trộn với DNA 1 tỷ lệ tích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh viên đạn, hỗn hợp được làm khô trên 1 đĩa kim loại mỏng, kích thước 0,5 – 0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn vừa khít với nòng súng. Thường đạn lớn làm bằng nhựa hay các vật liệu nhẹ. Khi bắn áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao ra khỏi đầu nòng súng một lưới thép mịn cản viên đạn lớn đạn lại, nhưng các hạt vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỉ lệ nhất định DNA ngoại lai hội nhập với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình chuyển gen.

* Các mẫu súng bắn gen:

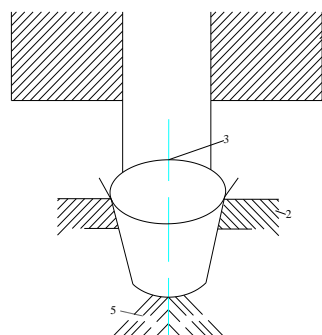
1) Súng bắn gen PDS-1000:

Áp lực đẩy viên đạn lớn được tạo ra bằng thuốc súng, vận tốc đầu nòng đạt 800m/giây. Tốc độ viên đạn có thể đạt trên 1300m/giây ở cách lưới chắn 2cm.



Hình 2.6. Cấu tạo súng bắn gen PDS-1000

- 1.kim hoả
- 2.thuốc súng
- 3.viên đạn lớn
- 4.nòng súng
- 5.lưới chắn
- 6.mô thực vật.



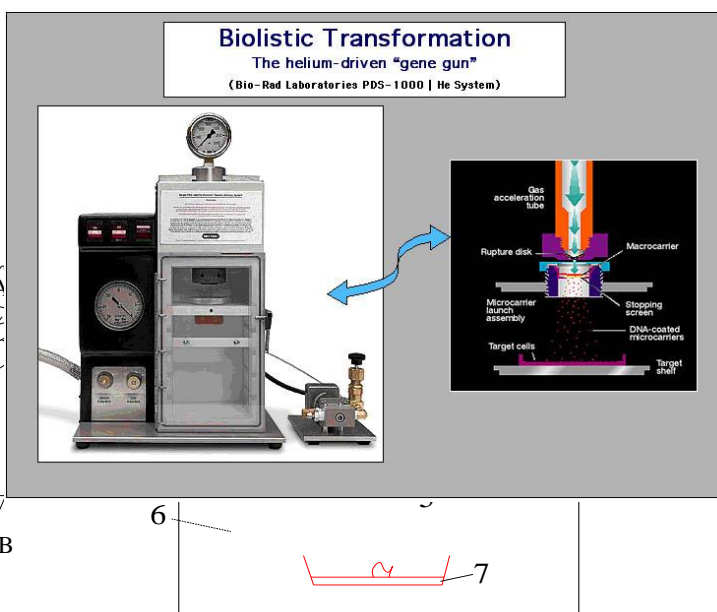
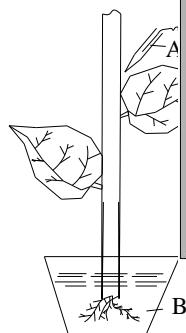
Hình 2.7. Phóng đại phần đầu nòng và lưới chắn

- 1.đầu nòng
- 2.bệ chặn
- 3.lưới chắn
- 4.viên đạn lớn
- 5.viên đạn.

2) Súng bắn gen PDS-1000He:

Trong đó helum nén được dùng để gia tốc viên đạn lớn thay cho thuốc súng, một lưới chắn bằng kim loại được cài đặt trên bệ chặn. Viên đạn được trộn với DNA và làm khô trên 1 đĩa kim loại nhỏ, sau đó gắn lên đầu viên đạn lớn. Loại này được dùng phổ biến hiện nay.

A. Phần đầu pipton bằng nhựa, thể tích khoảng 1ml. Đoạn đầu nhọn của pipton chứa agarose (tô đen) có hoà áp vào đỉnh sinh trưởng bị chậu này chứa đất nối với cực dương của



DNA ngoại lai, của 1 chồi phụ trồng, đất ẩm hệ điện di PDS-1000He

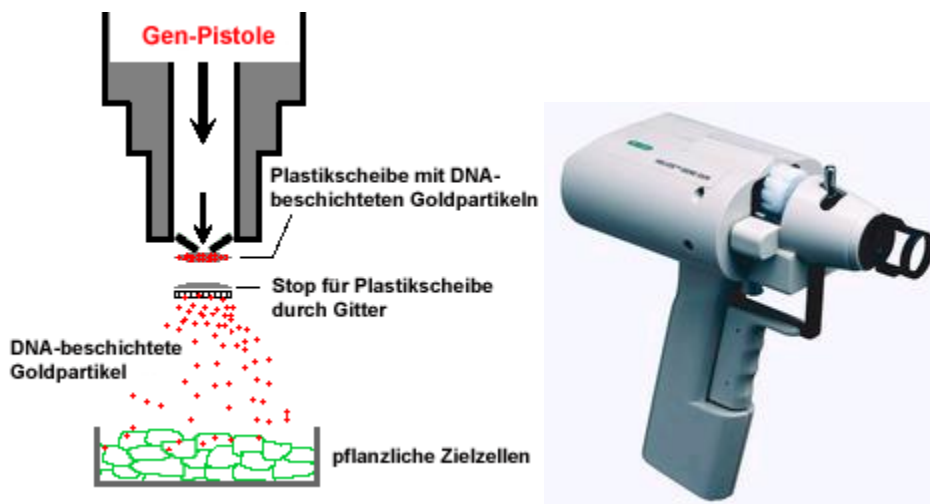
Hình 2.9. Cấu tạo PDS-1000HC

1. Bình chứa HC áp suất cao, 2. Màng giữ áp suất HC trong bình 1, màng này sẽ tách khi áp suất HC tăng vọt và cho khí HC thoát ra với tốc độ cao, 3. Viên đạn lớn, là đĩa kim loại mỏng, trên đó hỗn hợp DNA và vi đạn được kết tủa và làm khô, các vi đạn nằm ở mặt dưới nước đĩa, 4. Bộ bắn, 5. Lưới chắn, 6. Buồng bắn gen dưới áp chân không, 7. Mô thực vật.

Súng bắn gen Sautter 1991

Để tránh các yếu tố gây ra sự không đồng đều về vận tốc vi đạn. không dùng viên đạn lớn mà tạo ra các điều kiện để các hạt vi đạn lơ lửng trong không khí ngay trước khi chúng được gia tốc.

Ống pipeton là 1 ống thép, trong có 1 ống nhỏ thẳng góc với trục đầu ống nhỏ nằm trên trục ống. Trong ống nhỏ chứa 20 μ l hỗn hợp vi đạn bằng vàng và DNA. Ở áp suất 60bar và tốc độ khí 2m/giây, hỗn hợp sẽ lán thành sương mù có kích thước cơ XMIRON, các hạt này được thổi qua ống vi quản bằng thủy tinh có $\phi=300\mu\text{m}-400\mu\text{m}$ và dài 10mm. Các hạt sương mù chứa vi đạn và DNA được gia tốc khi chuyển qua ống vi quản và dưới ảnh hưởng của chân không ở buồng 9. Lượng hỗn hợp vi đạn và DNA được đo chính xác bằng bơm vi tiêm 6.

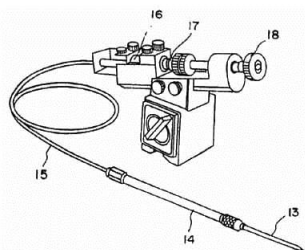


Hình 2.10. Súng bắn gen của Biorad.

Thiết bị điện xung (electroporator) là thiết bị có khả năng tạo ra các xung điện trong thời gian rất ngắn (5-6 phần nghìn giây) và ở điện thế (pulse strenght) chính xác (500 V/cm) với thời gian tắt dần (decay time) 20 ms. Protoplast được đặt giữa hai tấm kim loại cách nhau từ 1-4 mm trong một cuvette bằng nhựa. Ở điện thế cao, xung điện tạo các lỗ tạm thời (cỡ 30 nm) trên màng protoplast và DNA bên ngoài có thể xâm nhập vào chất nguyên sinh.

Xung điện được tạo ra khi giải phóng dòng điện chứa trong một điện dung (capacitor) từ điện cực này qua điện cực khác. Các vật nằm trong không gian giữa hai điện cực chịu tác động tắt dần của xung điện. Xung điện được xác định bởi hai giá trị là sự chênh lệch điện thế và thời gian tắt dần. Ở các thiết bị điện xung hiện đại, thời gian tắt dần được thu lại rất ngắn và trên biểu đồ xung điện được biểu diễn gần như một cột vuông. Nói chung, các thiết bị điện xung hoàn chỉnh được nhiều hãng cung cấp để thực hiện chuyển gen vào vi sinh vật, protoplast thực vật hoặc tế bào động vật.

Vi tiêm (microinjection) là kỹ thuật sử dụng phổ biến trong công nghệ tế bào động vật. Trên hiển vi thường, DNA plasmid có thể được tiêm vào protoplast và thực hiện biến nạp gen thành công ở khá nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, Kỹ thuật này hiện nay ít được các phòng thí nghiệm sử dụng, vì thao tác vi tiêm dưới kính hiển vi đòi hỏi thiết bị vi thao tác cực nhạy, thiết bị kéo và mài kim tiêm từ các ống thủy tinh. Ngoài ra, nó còn đòi hỏi kỹ năng thao tác và sự kiên nhẫn cao của kỹ thuật viên.



Hình 2.11. Chuyển gen bằng vi tiêm

PEG (polyethylene glycol) cùng với sự có mặt của Ca^{2+} là tác nhân dung hợp được sử dụng phổ biến nhất trong lai soma. Krens và cs (1982) là những người đầu tiên chứng minh có thể dùng PEG để chuyển trực tiếp DNA vào trong protoplast thực vật. Kỹ thuật này đòi hỏi phải nuôi protoplast với DNA trần có mặt PEG và $CaCl_2$. Sau khi hòa tan dần dần hỗn hợp, các protoplast được phân lập, rửa và cuối cùng dần trải trên môi trường chọn lọc. Tần số chuyển nạp trung bình ở protoplast thuộc lá khoảng từ 10^{-2} và 10^{-5} .

Cách tiến hành:

- Bổ sung PEG sau DNA
- Xử lý shock nhiệt protoplast ở $46^{\circ}C$ rồi làm lạnh trên băng.

PHẦN III: CHUYỂN GEN TRONG THỰC TẾ TRỒNG TRỌT

I. Tình hình cây trồng chuyển gen trên thế giới:

Năm 2006, diện tích toàn cầu cây trồng chuyển gen tiếp tục tăng cao vượt ngưỡng 100 triệu ha, khi lần đầu tiên hơn 10 triệu nông dân (10,3 triệu) tại 22 nước canh tác cây chuyển gen, cao hơn so với 90 triệu ha và 8,5 triệu nông dân tại 21 nước năm 2005.

Diện tích cây chuyển gen toàn cầu tăng hơn 60 lần trong 11 năm đầu tiên thương mại hóa, làm cho cây trồng chuyển gen được coi là kỹ thuật cây trồng được chấp nhận nhanh nhất trong lịch sử hiện đại. Diện tích cây chuyển gen toàn thế giới năm 2006 là 102 triệu ha, tương đương 250 triệu mẫu Anh, cao hơn so với 90 triệu ha hay 220 triệu mẫu Anh năm 2005. Sự gia tăng 12 triệu ha hay 30 triệu mẫu Anh giữa năm 2005 và 2006, là sự gia tăng cao thứ hai trong 5 năm trở lại đây, tương đương với tỷ lệ tăng trưởng hàng năm là 13% trong năm 2006. Đáng ghi nhận là hơn một nửa (55% hay 3,5 tỷ người) dân số của 6,5 tỷ người sống tại 22 nước có canh tác cây chuyển gen trong năm 2006 đã tạo ra lợi nhuận một

cách đáng kể. Cũng hơn một nửa (52% hay 776 triệu ha của 1,5 tỷ ha) diện tích đất trồng trên thế giới tại 22 nước năm 2006 đã canh tác cây chuyển gen.

Năm 2006, 22 nước trồng cây chuyển gen, có 11 nước đang phát triển và 15 nước công nghiệp, trong đó nếu tính theo thứ tự về diện tích, thì Hoa kỳ dẫn đầu, tiếp đến Argentina, Brazil, Canada, Ấn độ, Trung Quốc, Paraguay, Nam phi, Uruguay, Philippin, Úc, Rumani, Mê hi cô, Tây Ban nha, Côlômbia, Pháp, Iran, Honduras, Cộng hòa Czech, Bồ đào nha, Đức và Sloavakia.

Năm 2006, đứng sau Hoa kỳ là Argentina, Brazil, Canada, Ấn độ và Trung quốc là 6 nước chấp nhận trồng cây chuyển gen rộng rãi, với Ấn độ lần đầu tiên thay Trung quốc ở vị trí số 5 trên thế giới về cây bông BT. Hoa kỳ vẫn giữ vị trí dẫn đầu với 54,6 triệu ha (chiếm 53% diện tích cây chuyển gen toàn cầu), tiếp theo là Argentina với 18,0 triệu ha, Brazil – 11,5 triệu ha, Ấn độ - 3,8 triệu ha và Trung quốc 3,5 triệu ha.

Cây đậu nành chuyển gen vẫn giữ là cây chuyển gen chủ yếu năm 2005, đạt 58,6 triệu ha (chiếm 57% diện tích cây chuyển gen toàn cầu), tiếp theo là cây bắp (25,2 triệu ha – 25%), cây bông (13,4 triệu ha – 13%) và cây cải dầu (4,8 triệu ha – 5%). Giống cỏ alfalfa kháng thuốc trừ cỏ, là loại cây chuyển gen lâu năm đầu tiên được đưa vào trồng với diện tích 80.000 ha ở Hoa kỳ và giống bông kháng thuốc trừ cỏ RR@ Flex được đưa ra với diện tích 800.000 ha ở Hoa kỳ và Úc. Giống đu đủ kháng virus, là loại cây ăn quả được Ủy ban An toàn Sinh học quốc gia Trung quốc khuyến cáo thương mại hóa vào quý IV/2006.

Năm 2006, các giống đậu nành, bắp, cải dầu và cỏ alfalfa kháng thuốc trừ cỏ tiếp tục chiếm ưu thế với 68% hay 69,9 triệu ha, tiếp theo là giống kháng sâu BT với 19,0 triệu ha (19%) và các giống cây chuyển gen xếp chồng (chịu được cả thuốc trừ cỏ và kháng sâu chiếm 13,1 triệu ha (13%). Các giống chuyển gen xếp chồng là nhóm giống tăng trưởng nhanh nhất tới 30% giữa năm 2005 và 2006, so với 17% đối với nhóm kháng sâu và 10% đối với nhóm kháng thuốc trừ cỏ.

Cây chuyển gen được trồng bởi 10,3 triệu nông dân tại 22 nước năm 2006, so với 8,5 triệu nông dân tại 21 nước năm 2005. Đặc biệt là 90% hay 9,3 triệu nông dân nghèo từ các nước đang phát triển, đã tăng được thu nhập từ cây chuyển gen. Trong đó chủ yếu từ Trung Quốc – 6,8 triệu nông dân và Ấn Độ - 2,3 triệu. Trong giai đoạn 1996 đến 2006, tỷ lệ diện tích trồng cây chuyển gen ở các nước đang phát triển tăng hàng năm. Hơn 1/3 diện tích (40%) cây chuyển gen năm 2006, tương đương với 40,9 triệu ha là tại các nước đang phát triển. Sự tăng trưởng giữa năm 2005 và 2006 là 7,0 triệu ha hay 20% tăng trưởng ở các nước này cao hơn so với các nước công nghiệp – 5,0 triệu ha hay 9% tăng trưởng.

Sự tác động tích lũy toàn cầu của cây chuyển gen từ năm 1996 đến 2005 đã đem lại lợi nhuận thuần cho nông dân trồng cây chuyển gen là 27 tỷ USD (13 tỷ USD đối với các nước đang phát triển và 14 tỷ USD đối với các nước công nghiệp. Đã làm giảm tổng lượng thuốc trừ sâu từ năm 1996 đến 2005 là 224.000 tấn hoạt chất, tương đương với việc giảm 15% trong tác động môi trường xung quanh của sử dụng thuốc trừ sâu đối với các loại cây trồng trên.

II. Chuyển gen ở các cây trồng chính:

II.1. Cây ngô:

Cây ngô biến nạp gen đầu tiên tái sinh từ protoplast được biến nạp bằng xung điện đã bắt thụ (Rhodes và cs 1988). Có thể dùng phôi ngô trong nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi để tái sinh các cây hữu thụ mang gen biến nạp, sử dụng phương pháp bắn gen và chọn lọc bằng chất diệt cỏ “bialaphos” đã cho kết quả là mô callus phát sinh các phôi được biến nạp gen. Các cây biến nạp gen hữu thụ đã được tái sinh, ổn định di truyền và biểu hiện gen bar (kháng chất diệt cỏ glufosinate không chọn lọc) cùng với hoạt tính chức năng của enzyme phosphinothricin acetyltransferase quan sát được trong những thế hệ sau. Hiện nay, biến nạp gen ở ngô bằng phương pháp bắn gen được sử dụng rộng rãi. Gần đây, các kết quả biến nạp gen gián tiếp ở ngô nhờ *Agrobacterium* cũng đã được thông báo. Các thể biến nạp gen của dòng ngô lai gần (inbredline) A188 đã được tái sinh sau khi nuôi cấy chung (cocultivation) giữa vector “super-binary” với phôi non. Tần số được thông báo ở dòng A188 là khoảng 5-30%. Các thể lai thế hệ thứ nhất giữa dòng A188 và 5 dòng lai gần khác được biến nạp với tần số khoảng 0,4-5,3% (tính theo số cây biến nạp gen độc lập/phôi).

Bảng 3.1. Các cây trồng chính đã được biến nạp gen

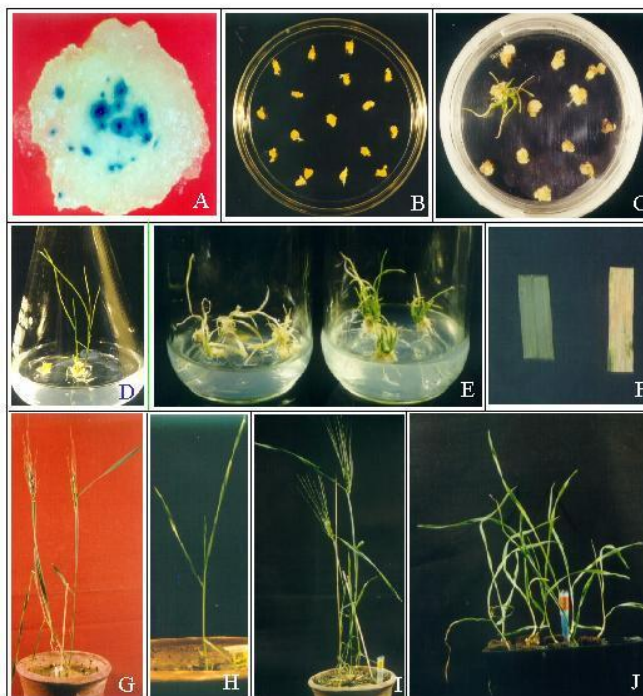
tt	Loài	Phương pháp biến nạp gen	Thử nghiệm trên đồng ruộng
0	Chuối	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
	Luá mạch	Bắn gen	Kháng vi rus
	Đậu tây	Bắn gen	-
	Canola	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ, điều khiển sự thụ phấn
	Sắn	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	-
	Ngô	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
	Bông	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, chống chịu chất diệt cỏ
	Đu đủ	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
	Đậu phụng	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
	Bạch dương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
1	Khoai tây	<i>Agrobacterium</i>	Kháng côn trùng, kháng virus, chống chịu chất diệt cỏ
2	Lúa	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
3	Đậu tương	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
4	Bí	Bắn gen/ <i>Agrobacterium</i>	Kháng virus
5	Củ cải đường	<i>Agrobacterium</i>	Chống chịu chất diệt cỏ
6	Mía	Bắn gen	-

7	Hướng dương	Bản gen	-
8	Cà chua	Agrobacterium	Quả chín muộn, kháng virus
9	Lúa mì	Bản gen	-

II.2. Cây lúa:

Phương pháp bản gen hiện biến nạp gen hiệu quả kiểu gen độc lập, và hiện đã được biến nạp gen vật sử dụng là phôi non và nguồn gốc từ hạt trưởng Hygromycin B là marker được dùng cho lúa. Tần số cao tới 50% (tính theo số có nguồn gốc độc lập/số gen).

Hình 3.1. Chọn lọc hạn bằng cách chuyển gen Gần đây, kỹ thuật thông qua Agrobacterium cải tiến quan trọng có hiệu với kỹ thuật bản gen.



gen cho phép thực ở lúa trong các nay hơn 40 giống thành công. Mẫu các callus có thành. chọn lọc thường biến nạp có thể cây biến nạp gen mẫu được bản

giống lúa chịu chịu hạn cho lúa biến nạp gen ở lúa cũng đã có những quả tương đương

II.3. Cây lúa mì:

Phương pháp bản gen cũng được sử dụng để biến nạp gen ở lúa mì. DNA ngoại lai được bản vào trong các vảy nhỏ (scutellum) của phôi non của hai giống mùa xuân và một giống mùa đông. Các callus chống chịu được chọn lọc bằng phosphinothricin hoặc các nhân tố ức chế trao đổi chất tương tự như basta, bialaphos hoặc glufosinate amonium. Chọn lọc bằng các hợp chất như thế không hiệu quả lắm và kết quả là một số lớn cây thoát. Phân tích di truyền và phân tử đã xác nhận sự hợp nhất ổn định của các gen biến nạp. Nói chung, công nghệ di truyền lúa mì vẫn còn tập trung ở một hoặc hai giống đặc trưng có khả năng tái sinh cây nhanh, thích hợp với phương pháp bản gen.

II.4. Cây lúa mạch:

Wan và Lemaux (1994), đã tái sinh một số lượng lớn các cây lúa mạch biến nạp gen độc lập, tự thụ phấn. Các phôi hợp tử non, các callus mới hình thành và các phôi có nguồn gốc từ tiểu bào tử hạt phấn đã được dùng để bản gen với plasmid mang gen bar và gusA đơn độc hoặc phối hợp với plasmid khác mang gen protein vỏ của virus gây bệnh lùn vàng ở lúa

mạch. Kiểm tra khả năng nảy mầm của phôi non để phân lập các cây biểu hiện hoạt tính bar bằng môi trường chứa bialaphos, mặc dù đây chưa phải là một chất chỉ thị tốt cho sự có mặt hoặc không của gen.

II.5. Cây đậu tương:

Kết quả đầu tiên ở đậu tương là phục hồi thành công cây biến nạp gen nhờ *Agrobacterium*. Phương thức này dựa vào sự phát sinh chồi từ lá mầm của giống Peking chọn lọc cho tính miễn cảm với *Agrobacterium*. Các mẫu lá mầm được xâm nhiễm với *Agrobacterium* mang plasmid kháng kanamycin và có hoạt tính *gusA*, hoặc kháng kanamycin và chống chịu glyphosate. Có thể biến nạp gen hiệu quả vào protoplast đậu tương bằng các phương thức thông dụng nhưng rất khó tái sinh được cây.

Để biến nạp gen vào các giống đậu tương khác nhau người ta đã phối hợp hai yếu tố: genotype đơn giản - phương thức tái sinh cây độc lập (dựa trên cơ sở sự tăng sinh của cụm chồi từ vùng chung quanh mô phân sinh của trụ phôi) với sự tăng gia tốc của vi đạn (particle) có phóng điện để phân phối DNA ngoại lai. Hàng trăm cây đậu tương có nguồn gốc độc lập đã thu được và kết quả biến nạp đã cho nhiều phenotype khác nhau. Nói chung, ở các dòng đậu tương biến nạp gen có nhiều bản sao của các gen biến nạp (số bản sao khoảng từ 1-50 nhưng thường thay đổi từ 2-10). Phân tích DNA (southern blot) ở thế hệ sau của các bản sao gen phức cho thấy tất cả các bản sao cùng tách rời, như thế mỗi thể biến nạp sơ cấp chỉ hiện diện một kết quả biến nạp độc lập và có thể sự tái tổ hợp thống nhất đã không xuất hiện thường xuyên.

II.6. Cây bông:

Phương thức biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng để biến nạp gen vào cây bông giống Coker 312 (Umbeck 1987). Cây bông biến nạp gen cũng của giống trên đã được phục hồi sau khi bắn gen vào dịch huyền phù nuôi cấy phát sinh phôi (Finer và McMullen 1990). Hầu hết các giống bông có giá trị kinh tế khác không thể tái sinh cây từ giai đoạn callus. Một số ít các giống đó có thể tái sinh cây nhưng quá trình này thiên về biến dị dòng vô tính.

KẾT LUẬN

- Tóm lại công nghệ chuyển gen ở thực vật bậc cao đã mở ra cho chúng ta một hướng mới trong công tác tạo giống cây trồng mới nhằm đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của con người đồng thời để giải quyết tình trạng lương thực hiện nay khi mà dân số ngày càng tăng nhanh trong khi diện tích đất phục vụ cho sản xuất nông nghiệp ngày càng giảm đi. Nhìn chung việc ứng dụng cây chuyển gen đã có những lợi ích rõ rệt như sau: tăng sản lượng, giảm chi phí sản xuất, tăng lợi nhuận nông nghiệp, cải thiện môi trường.

- Một số nguyên tắc sinh học cơ bản của việc chuyển gen:
 - + Không phải toàn bộ tế bào đều thể hiện tính toàn năng.
 - + Các cây khác nhau có phản ứng không giống nhau với sự xâm nhập của một gen ngoại lai.

+ cây biến nạp chỉ có thể tái sinh từ các tế bào có khả năng tái sinh và khả năng thu nhận gen biến nạp vào genome.

+ Mô thực vật là hỗn hợp các quần thể tế bào có khả năng khác nhau.

+ Thành phần của các quần thể tế bào được xác định bởi loài, kiểu gen, từng cơ quan, từng giai đoạn phát triển của mô và cơ quan.

+ Thành tế bào ngăn cản sự xâm nhập của ADN ngoại lai.

+ Khả năng xâm nhập ổn định của gen vào genome không tỷ lệ với sự biểu hiện tạm thời của gen.

+ Các ADN (trừ virus) khi xâm nhập vào genome của tế bào vật chủ chưa đảm bảo là đã liên kết ổn định với genome.

+ Các ADN (trừ virus) không chuyển từ tế bào này sang tế bào kia, nó chỉ ở nơi mà nó được đưa vào.

+ Trong khi đó, ADN của virus khi xâm nhập vào genome cây chủ lại không liên kết với genome mà chuyển từ tế bào này sang tế bào khác ngoại trừ mô phân sinh.

- Quá trình chuyển gen được thực hiện theo các bước sau:

+ Xác định gen liên quan đến tính trạng cần quan tâm.

+ Phân lập gen.

+ Gắn gen vào vector biểu hiện để biến nạp.

+ Biến nạp vào *E.coli*.

+ Tách chiết ADN plasmid.

+ Biến nạp vào mô hoặc tế bào thực vật.

+ Chọn lọc các cá thể biến nạp trên môi trường chọn lọc.

+ Tái sinh cây biến nạp.

+ Phân tích để xác định cá thể chuyển gen và đánh giá mức độ biểu hiện của chúng.

- Một số phương pháp chuyển gen:

+ Biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium*:

+ Chuyển gen bằng phương pháp bắn gen:

+ Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng xung điện:

+ Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng kỹ thuật vi tiêm:

+ Chuyển nạp DNA ngoại lai vào protoplast bằng PLO và PEG:

Hiện nay ở nước ta lĩnh vực nghiên cứu tạo sinh vật biến đổi gen, nghiên cứu chuyển gen vào cây trồng (GM) đang được tiếp cận, đầu tư và triển khai nghiên cứu, ứng dụng với sự chú trọng đặc biệt. Nhiều gen quý có giá trị ứng dụng như năng suất, chất lượng, khả năng chống chịu đã được phân lập và nghiên cứu nhằm chuyển vào cây trồng để tạo nên những giống lý tưởng.