

**TRẦN THỊ LỆ (chủ biên)  
NGUYỄN HOÀNG LỘC-TRẦN QUỐC DUNG**

**GIÁO TRÌNH**

**CÔNG NGHỆ GEN  
TRONG NÔNG NGHIỆP**

**HUẾ 2006**

# Lời nói đầu

Giáo trình này được biên soạn nhằm cung cấp cho sinh viên những kiến thức cơ bản và ứng dụng của công nghệ gen trong lĩnh vực nông nghiệp.

Do sách được xuất bản lần đầu và công nghệ sinh học là một ngành khoa học phát triển rất nhanh chóng đặc biệt trong thời gian gần đây nên khó tránh khỏi thiếu sót. Tuy vậy, chúng tôi vẫn mạnh dạn xuất bản với mong muốn phục vụ cho nhu cầu học tập của sinh viên ngành nông nghiệp.

Chúng tôi rất mong được các đồng nghiệp và sinh viên đóng góp nhiều ý kiến để cho lần biên soạn sau đạt được chất lượng tốt hơn. Những nhận xét và ý kiến đóng góp xin vui lòng gửi về Khoa Nông học, Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Chúng tôi trân trọng cảm ơn TS. Lê Việt Dũng đã đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho giáo trình này. Xin chân thành cảm ơn Dự án Giáo dục Đại học Huế đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành giáo trình.

**Các tác giả**

## Chương 1

### Sản xuất, xác nhận và độ bền vững của cây trồng chuyển gen

#### 1.1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

Cho đến nay hơn 150 loài thực vật khác nhau, trong đó có rất nhiều loài cây trồng, đã được chuyển gen thành công. Những thực vật chuyển gen và các diễn biến nổi bật của công nghệ gen thực vật được giới thiệu ở bảng 1.1. Để tạo ra cây biến đổi gen trong những năm qua một loạt các phương pháp khác nhau đã được thực hiện. Trong đó, ba phương pháp sau đây được sử dụng phổ biến (giới thiệu ở các mục từ 1.1.1 đến 1.1.3).

**Bảng 1.1. Diễn biến nổi bật của công nghệ gen thực vật.**

Năm	Những phát triển quan trọng
1980	- Lần đầu tiên chuyển DNA vi khuẩn vào thực vật nhờ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
1983	- Marker chọn lọc, Ti-plasmid được loại bỏ các gen không cần thiết.
1984	- Biến nạp vào tế bào trần.
1985	- Kháng thuốc diệt cỏ.
198	- Kháng virus. - Lần đầu tiên đưa cây biến đổi gen ra đồng ruộng.
1987	- Kháng côn trùng. - Biến nạp phi sinh học.
1988	- Điều khiển sự chín ở cà chua.
1989	- Kháng thể ở thực vật bậc cao.
1990	- Biến nạp phi sinh học ở ngô. - Tính bất dục đực nhân tạo.
1991	- Thay đổi thành phần carbohydrate. - Tạo alkaloid tốt hơn.

1992	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thay đổi acid béo</li> <li>- Biến nạp phi sinh học ở lúa mì.</li> <li>- Lần đầu tiên phân giải plastic nhờ cây biến đổi gen.</li> <li>- Cà chua biến đổi gen FlavorSaver xuất hiện trên thị trường.</li> </ul>
1994	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lần đầu tiên hơn 10 gen được chuyển đồng thời vào thực vật.</li> </ul>
1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trên thế giới có 48, trong đó Mỹ có 35, loại thực vật biến đổi gen được thị trường hóa.</li> <li>- Lúa biến đổi gen với giá trị dinh dưỡng tốt hơn.</li> <li>- Cây biến đổi gen được trồng trên diện tích hơn 40 triệu ha.</li> </ul>
1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cho đến nay khoảng 9.000 thí nghiệm về cây biến đổi gen được đưa ra đồng ruộng (ở EU: 1.360).</li> </ul>

Phương pháp chuyển gen được chọn lựa tùy thuộc các loại vector biến nạp được sử dụng. Các vector này là các plasmid đã được thiết kế thích hợp.

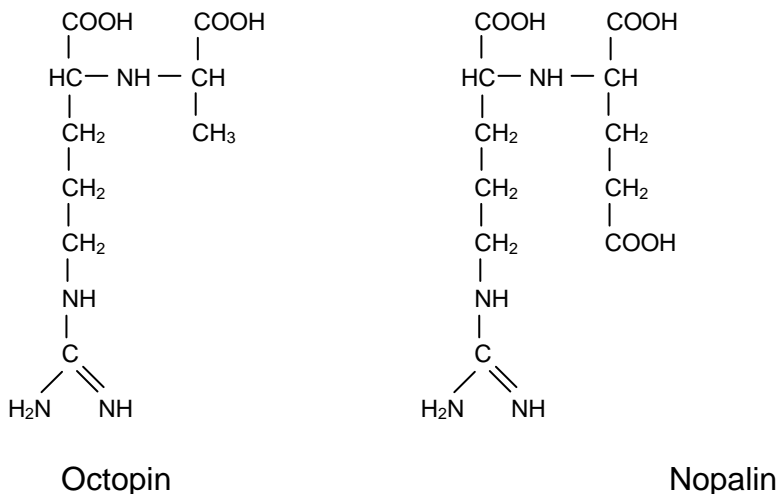
#### 1.1.1. Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Mục đích của công nghệ gen thực vật là tạo ra những cây biến đổi gen có những đặc tính mới. Ở đây, DNA ngoại lai được đưa vào tế bào thực vật và tồn tại bền vững trong hệ gen (genome). Các vi khuẩn đất *A. tumefaciens* và một số loài họ hàng của chúng có khả năng chuyển một phần nhỏ DNA vào tế bào thực vật và qua đó kích thích tạo khối u (callus). Những khối u này là không gian sống của vi khuẩn. Một số chất dinh dưỡng (opine) có lợi cho vi khuẩn cũng được tạo ra trong những khối u này. Những opine phổ biến nhất là nopaline và octopine.

Về hóa học opine là những sản phẩm ngưng tụ của một amino acid với một cetoacid hoặc một amino acid với đường. Octopine được tạo nên từ các amino acid là arginine và pyruvate, còn nopaline được tạo nên từ arginine và  $\alpha$ -cetoglutaraldehyd. Công thức cấu tạo của opine được trình bày ở hình 1.1.

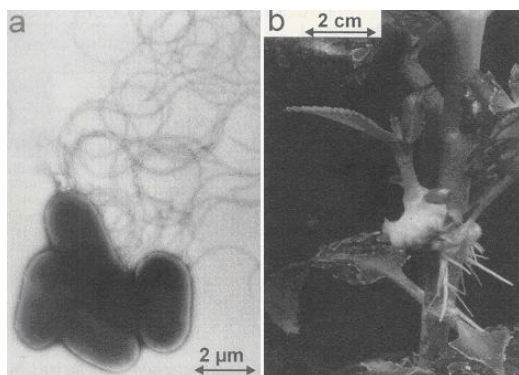
*A. tumefaciens* đã thực hiện “kỹ thuật gen” với mục đích tạo ra cây biến đổi gen có lợi cho nó. Như vậy, việc khẳng định kỹ thuật gen là một quá trình nhân tạo là không hoàn toàn đúng. Khả năng chuyển DNA của *A. tumefaciens* được ứng dụng trong công nghệ gen hiện đại. Để hiểu được quá

trình này, điều đầu tiên là cần làm rõ sự tương tác sinh học giữa *Agrobacterium* với thực vật.



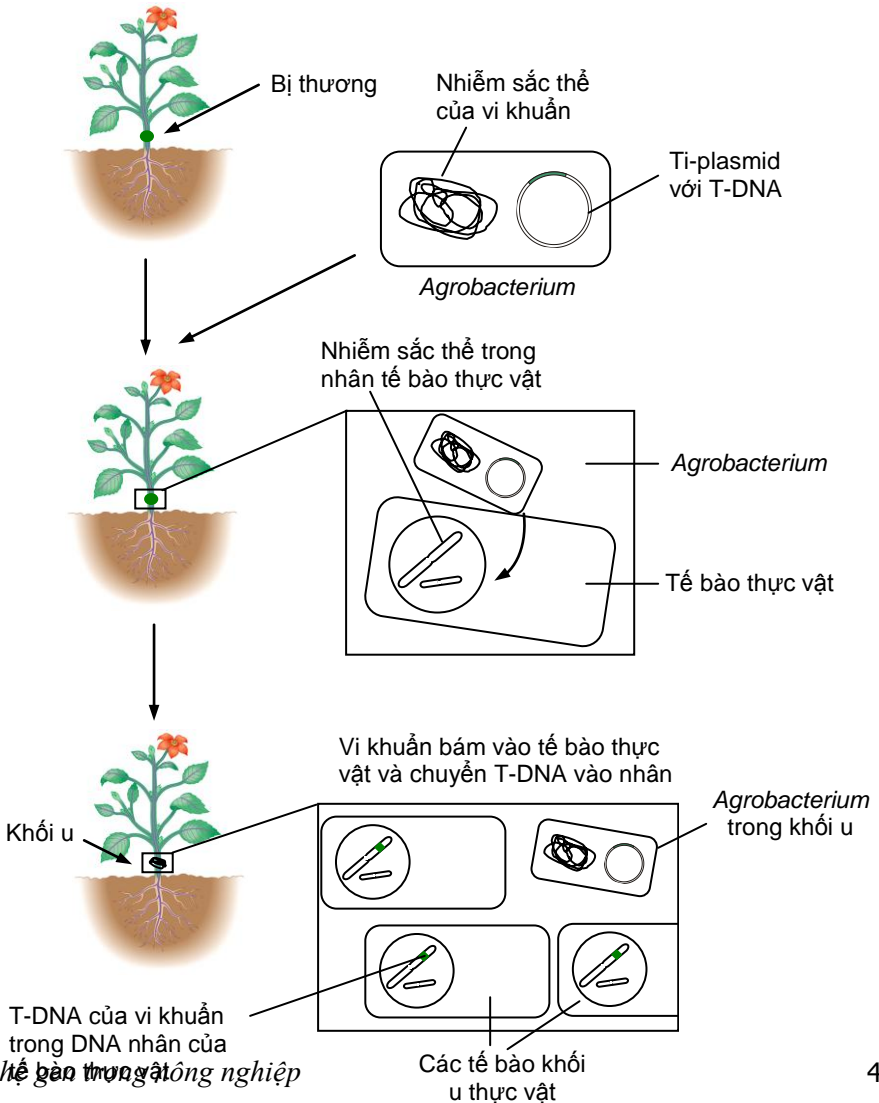
**Hình 1.1. Công thức cấu tạo của opine.**

Việc sử dụng *A. tumefaciens* bắt đầu từ 1970, khi người ta phát hiện vi khuẩn này có khả năng tạo nên khối u ở cây hai lá mầm bị thương, được gọi là khối u cổ rễ (Hình 1.2). Trong những năm 1970, các nhà khoa học đã tìm thấy trong các chủng *A. tumefaciens* tạo khối u có một plasmid rất lớn kích thước khoảng 200-800 kb. Từ những thí nghiệm trên những chủng *A. tumefaciens* không độc (không có plasmid này), người ta đã khẳng định plasmid nói trên cần thiết cho việc tạo khối u. Vì vậy, chúng được gọi là Ti-plasmid (tumor inducing-plasmid).



**Hình 1.2. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.** a: Dưới kính hiển vi điện tử. b: Khối u ở cây và từ khối u này xuất hiện chồi một cách tự nhiên.

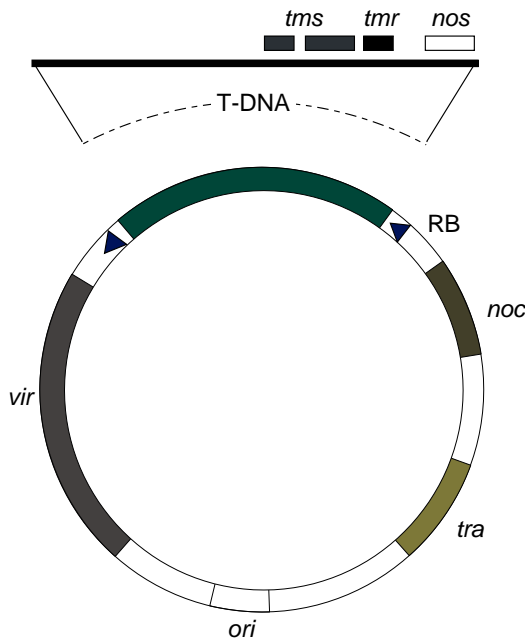
Ti-plasmid mang các gen mã hóa cho protein phân giải opine, nhận biết những tế bào thực vật bị thương, cắt và vận chuyển đoạn T-DNA (transfer-DNA). T-DNA là một phần của Ti-plasmid, được chuyển vào thực vật. Trên đó định vị những gen tạo khối u và tổng hợp opine. T-DNA được giới hạn bởi hai vùng, bờ trái và bờ phải (LB: left border và RB: right border). Các bờ này gồm một trình tự lặp lại của 25 bp, là trình tự nhận biết cho việc cắt T-DNA. T-DNA được đưa vào DNA trong nhân tế bào thực vật. Vị trí gắn vào thường là ngẫu nhiên, tuy nhiên thường là những vùng có khả năng sao chép. Quá trình lây nhiễm được mô tả ở hình 1.3.



**Hình 1.3. Sơ đồ lây nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.**

Trong opine người ta phân biệt hai loại octopin và nopalín. Một số chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa Ti-plasmid của loại octopin và một số khác là của nopalín. Những plasmid octopin chỉ có thể tạo octopin và phân giải chúng, nhưng không tạo và phân giải được nopalín.

Có sự khác nhau giữa các loại plasmid ở *Agrobacterium*, đó là Ti-plasmid của loại nopalín chỉ chứa một bản sao (copy) của T-DNA, trong khi plasmid octopin chứa đến ba bản sao. Ở hình 1.4, trên đoạn T-DNA định vị những gen tổng hợp opine và tạo khối u. Khối u được tạo nên là do hai loại phytohormone (auxin và cytokinin) được tạo ra ở trong tế bào thực vật bị nhiễm, chúng kích thích sự phân chia tế bào và tạo nên mô không phân hóa (callus).



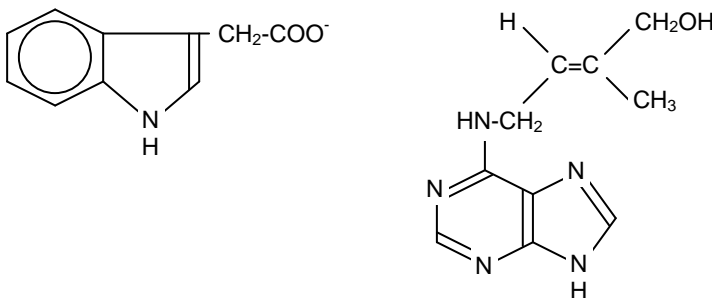
**Hình 1.4. Ti-plasmid của *Agrobacterium* dạng nopalín.** T-DNA: Transfer-DNA, LB: Bờ trái, RB: Bờ phải, *ori*: khởi đầu sao chép của *A. tumefaciens*. *noc*: Phân giải nopalín, *nos*: Tổng hợp nopalín. *tmr*: Tổng hợp cytokinin,

*tms*: Tổng hợp auxin, *tra*: Vận chuyển tiếp hợp, *vir*: Vùng virulence (vùng độc tính).

Điều kiện cho việc chuyển T-DNA vào thực vật trước hết là tế bào bị thương. Khi tế bào bị thương chúng tiết ra các hợp chất phenol (acetosyringone), chất có vai trò quan trọng trong việc nhận biết và gắn kết vi khuẩn với tế bào thực vật. Cơ chế nhận biết được giải thích là nhờ tính đặc hiệu của *A. tumefaciens* với cây hai lá mầm, ở cây một lá mầm thì phản ứng này chỉ có ở một ít loài. Vì vậy, *Agrobacterium* chỉ được sử dụng hạn chế cho việc biến nạp gen ở cây một lá mầm. Khi bổ sung syringone người ta có thể biến nạp gen vào nấm nhờ *A. tumefaciens*. Thực vật một lá mầm quan trọng như ngô cũng có thể được biến nạp bằng *A. tumefaciens*.

### Khối u xuất hiện bởi những gen của *A. tumefaciens*

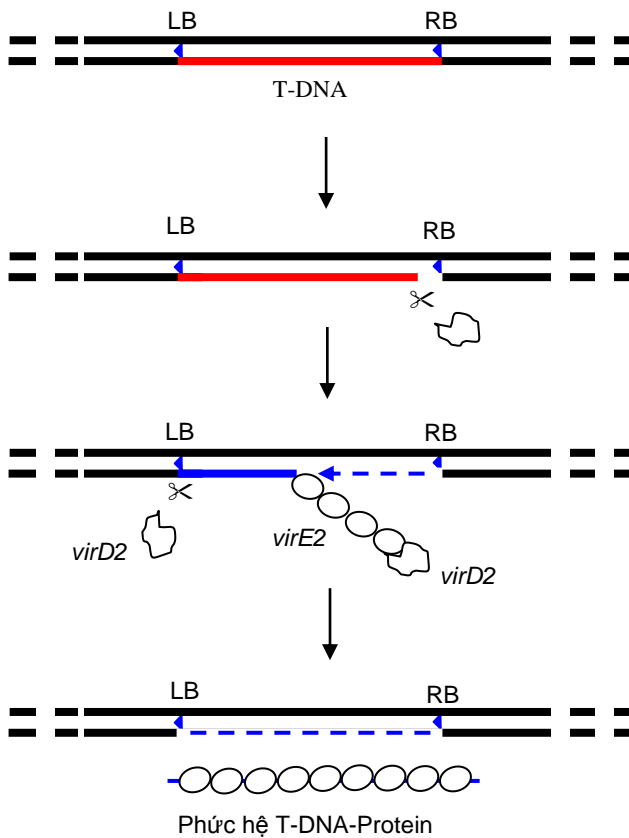
Sự phát triển khối u sau khi nhiễm *A. tumefaciens* dựa trên tác dụng của hai phytohormone. Các enzyme cần thiết cho tổng hợp phytohormone được mã hóa chủ yếu từ những gen trên T-DNA. Sự tổng hợp auxin được thực hiện bởi hai gen là *tms1* và *tms2*. Gen *tms1* mã hóa tryptophan-2-monooxygenase xúc tác cho sự biến đổi tryptophan thành indol-3-aceamide. Sản phẩm của gen *tms2* là indol-3-acetamide-hydrogenase, xúc tác để tạo ra auxin là indolylacetic acid (IAA). Ngoài ra, T-DNA còn mang gen *tmr* mã hóa cho enzyme isopentenyltransferase. Enzyme này gắn 5'-AMP vào chuỗi bên isoprenoid để tổng hợp nên tiền cytokinin là isopentenyladenin và isopentenyladenosin. Hydroxyl hóa tiền cytokinin bằng những enzyme thực vật để tạo nên cytokinin. Auxin được tạo nên cùng với cytokinin làm cho khối u lớn lên, nhờ kích thích sự phân chia của các tế bào không phân hóa.





**Hình 1.5. Cấu tạo của indol-3-acetate (một loại auxin) và zeatin (một loại cytokinin).**

*A. tumefaciens* nhận biết acetosyringone nhờ một chất nhận, được mã hóa bằng một gen ở vùng *vir* (virulence), vùng *vir* bao gồm nhiều gen. Sự nhận biết bằng chất nhận dẫn đến sự hoạt hóa của tất cả gen *vir*. Một sản phẩm gen *vir* khác là một endonuclease nhận biết bờ phải và trái của T-DNA và cắt T-DNA ở những vị trí này. Sau đó, một protein gắn vào sợi đơn của T-DNA và phức hệ này được chuyển vào thực vật cũng nhờ tác dụng của các sản phẩm gen *vir* (Hình 1.6).



**Hình 1.6. Sơ đồ biểu diễn quá trình di chuyển T-DNA của Ti-plasmid.**

1: T-DNA với bờ phải và bờ trái được chèn vào Ti-plasmid. 2: Sợi đơn được cắt ra nhờ protein được mã hóa bởi gen *virD2*. 3: Sợi đơn của T-DNA được

giải phóng và kết hợp với protein do *virD2* và *virE2* mã hóa, chỗ đứt ở sợi đơn thứ hai được tổng hợp bổ sung. 4: Lắp đầy chỗ trống trong Ti-plasmid (đường gạch nối đậm). Sợi T-DNA tự do được vận chuyển vào tế bào thực vật ở dạng phức hệ DNA-protein.

Quá trình này phức tạp nên không thích hợp cho việc ứng dụng trong công nghệ gen vì có ba nguyên nhân sau:

- Do tạo khối u nên không thể tái sinh được cây hoàn chỉnh và khỏe mạnh từ tế bào biến nạp gen.

- Sự tổng hợp opine là không mong muốn vì cây tiêu tốn năng lượng không cần thiết.

- DNA lạ (ngoại lai) không thể đưa vào Ti-plasmid cũng như T-DNA. Những plasmid có kích thước > 200 kb là quá lớn, khó thao tác trong phòng thí nghiệm.

Người ta đã thành công trong việc sửa đổi Ti-plasmid và T-DNA để các phytohormone này không được tạo nên. Trong những bước tiếp theo gen tổng hợp opine được cắt ra và đưa vào những gen chỉ thị (xem mục 1.2), ví dụ: gen kháng kanamycin. Ngày nay, người ta sử dụng hệ thống được gọi là vector hai nguồn (binary vector), ở đây chức năng của Ti-plasmid được thực hiện hai ở plasmid.

Plasmid lớn mang vùng *vir* và plasmid nhỏ mang bờ trái và phải của T-DNA. Đây là những vùng của T-DNA duy nhất cần thiết cho việc vận chuyển gen vào thực vật, plasmid nhỏ là đủ cho vận chuyển chính xác thậm chí chỉ với một bờ. Giữa bờ phải và trái một gen chọn lọc và những gen lạ được chèn vào. Sơ đồ cấu tạo của một vector hai nguồn được giới thiệu ở hình 1.7. Ưu điểm của vector này là các thao tác chỉ thực hiện với plasmid nhỏ. Tất cả những công việc tạo dòng, cả việc đưa DNA lạ, có thể thực hiện trong những tế bào *E. coli*, còn plasmid lớn đã hoàn thiện và được chuyển vào *A. tumefaciens*.

Quá trình biến nạp được thực hiện ở những mô thực vật phù hợp, ví dụ: mô lá. Chúng được ủ với vi khuẩn *A. tumefaciens*, sau đó vi khuẩn được loại bỏ và mô tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

Cây *Arabidopsis thaliana* đã trở thành cây mô hình quan trọng trong nghiên cứu di truyền thực vật. Phương pháp biến nạp được mô tả là phương