

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH VÀ ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU TẠO CÂY CẢI NGỌT CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU

Mã số đề tài: 10521

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. NGUYỄN VĂN UYÊN

Cơ quan công tác: Viện Sinh học nhiệt đới

Địa chỉ liên lạc: 1- Mạc Đĩnh Chi, Q. I ,

Điện thoại: 8978796

E-mail: geneng@hcm.vnn.vn

Thành viên tham gia:

- TS. Nguyễn Hữu Hồ
- KS. Lê Tấn Đức
- ThS. Phạm Thị Hạnh
- CN. Phan Tường Lộc
- CN. Mai Trường

1. Tóm tắt mục đích, nội dung nghiên cứu

- Xây dựng hệ thống tái sinh cây cải ngọt thông qua việc nuôi cấy các cơ quan mô tế bào khác nhau như lá mầm và trụ mầm và nghiên cứu ảnh hưởng của các chất chọn lọc đến khả năng tái sinh của cây tạo tiền đề cho việc chuyển gen.
- Xây dựng hệ thống chuyển gen cho cây cải ngọt.
- Kiểm tra thể hiện gen bằng các phương pháp: trong môi trường có chất chọn lọc và phản ứng PCR

2. Kết quả nghiên cứu của đề tài về mặt khoa học

- Xây dựng hoàn chỉnh hệ thống tái sinh cây cải ngọt từ lá mầm và trụ mầm với kết quả như sau: sự tái sinh từ lá mầm cải ngọt là sự tái sinh thông qua mô sẹo ở cuống lá mầm và sự tái sinh trụ mầm cũng từ mô sẹo. Sự kết hợp giữa môi trường MS với 4 mg/l BA và 2 mg/l NAA kích thích mạnh mẽ sự tái sinh từ lá mầm và trụ mầm đặc biệt lá mầm cho khả năng tái sinh rất cao đạt khoảng 80%.
- Hoàn tất việc khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc Phosphinothricin (PPT) đến khả năng tái sinh của lá mầm, trụ mầm và cây cải ngọt đối chứng (không chuyển gen).
- Nghiên cứu khả năng chuyển gen từ lá mầm thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: Chúng tôi tiến hành chuyển gen nhiều lần với số lượng lá mầm khá lớn (gần 1500 mẫu). Nhận thấy số lượng lá mầm chống chịu với chất chọn lọc (4mg/l PPT) để hình thành mô sẹo khoảng 3,7% nhưng số lượng có thể tái sinh chồi chỉ ở mức 1,5% và gần như đa số các chồi đều không phát triển và chết ở các lần cấy truyền sau, đây là hiện tượng được coi là escape khá phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen do chồi ở thể khảm (tế bào chuyển gen và không chuyển gen phát triển

cùng lúc) và chỉ còn 2 chồi tiếp tục phát triển trên môi trường MS với 6 mg/l PPT- cho thấy tần số chuyển gen thấp.

- Nghiên cứu khả năng chuyển gen cây cải từ trụ mầm thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: Sử dụng trụ mầm của cây gieo từ hạt 5-6 ngày tuổi, cây trụ mầm vào môi trường tái sinh 3-4 ngày trước khi cho trụ mầm tiếp xúc với dịch vi khuẩn để lây nhiễm, thời gian nuôi chung với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* là hai ngày trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 100 μ M Acetosyringone và sau khi rửa trụ mầm được cấy trên môi trường tái sinh có chất chọn lọc là 3 mg/l PPT. Sau 3-4 tuần các chồi tái sinh được tiếp tục cấy truyền trên môi trường MS có 6 mg/l PPT để kiểm tra cây chuyển gen. Chúng tôi tiến hành chuyển gen nhiều lần với số lượng trụ mầm khá lớn (hơn 1500 mẫu). Chúng tôi nhận thấy số lượng trụ mầm chống chịu với chất chọn lọc 3mg/l PPT để hình thành mô sẹo khá (khoảng 5%) nhưng số lượng có thể tái sinh chồi chỉ ở mức khoảng 0,5% tuy nhiên đa số các chồi đều không phát triển và chết ở các lần cấy truyền sau và chỉ còn 2 chồi tiếp tục phát triển trên môi trường MS với 6 mg/l PPT- cho thấy tần số chuyển gen không cao.

- Sử dụng phương pháp PCR để xác định gen cryIA trong cây cải giả định chuyển gen. Kết quả cho thấy các mẫu ADN của cây giả định chuyển gen sau khi chạy điện di có xuất hiện các băng có kích thước 0,65Kb, chúng là kết quả của sự khuếch đại gen cryIA(c) trong khi mẫu cây đối chứng hoàn toàn không có băng.

- Đã trồng các cây cải ngọt giả định chuyển gen tại vườn ươm để kiểm tra khả năng kháng sâu *Heliothis armigera*, kết quả cho thấy khả năng kháng sâu của một dòng khá rõ còn các dòng khác không có sự khác biệt so với đối chứng.

3. Ý nghĩa thực tiễn và hiệu quả ứng dụng thực tiễn

- Góp phần nâng cao trình độ nghiên cứu ứng dụng công nghệ chuyển nạp gen trong công tác tạo giống cây trồng.

- Tạo dòng cải ngọt kháng sâu hướng phục vụ cho sản xuất nông nghiệp

4. Kết quả đào tạo sau đại học

Thạc sĩ: 0

Tiến sĩ: 0

5. Sản phẩm khoa học đã hoàn thành

5.1. Các báo cáo khoa học tại các hội nghị, hội thảo KH

[1]. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Phạm Thị Hạnh, Nguyễn Văn Uyển, 2005. Ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc đến mô cây cải ngọt (*Brassica integrifolia*) và nghiên cứu tạo cây cải chuyển gen. Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Sự sống, Hà Nội, 3/11/2005. trang 1194-1197

[2]. Phạm Thị Hạnh, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyển, 2005. Khảo sát khả năng tái sinh in vitro cây cải ngọt (*Brassica integrifolia*) từ lá mầm và trụ mầm phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen. Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Sự sống, Hà Nội, 3/11/2005. trang 498-500

- [3]. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, Phạm Thị Hạnh, Nguyễn Văn Uyên, 2005. Nghiên cứu tạo cây cải ngọt (*Brassica integrifolia*) chuyển gen kháng sâu từ trụ mầm thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Bài đã gửi đăng Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học trong nghiên cứu cơ bản, Hà Nội, 6/12/2005.

6. Đánh giá và kiến nghị

Đề tài đã được thực hiện đúng tiến độ dự kiến, hoàn thành các mục tiêu đề ra

- 1) Xây dựng hoàn chỉnh hệ thống tái sinh in vitro cây cải ngọt đối với hai giống cải và nghiên cứu ảnh hưởng của chất chọn lọc PPT đến lá mầm, trụ mầm và cây.
- 2) Quy trình chuyển gen cho cây cải ngọt với nguồn nguyên liệu là lá mầm và trụ mầm thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- 3) Kiểm tra cây cải ngọt giả định chuyển gen in vitro bằng chất chọn lọc PPT và kỹ thuật PCR.
- 4) Thử tính kháng sâu của các dòng cải ngọt giả định chuyển gen tại vườn ươm.
- 5) Trồng thử nghiệm cây cải ngọt chuyển gen kháng sâu tại vườn ươm để kiểm tra tính ổn định của gen chuyển và khả năng di truyền ở thế hệ sau.

STUDIES ON THE HIGH FREQUENCY SHOOT REGENERATION SYSTEM AND PRODUCTION OF TRANSGENIC *BRASSICA INTEGRIFOLIA* RESISTANT TO INSECT

ABSTRACT

- Study on high frequency shoot regeneration system of *Brassica integrifolia* for genetic transformation. Effect of selective agent on the growth of *Brassica integrifolia* tissues used in plant transformation.
- Development of transgenic *Brassica integrifolia* plants resistant to insect from hypocotyl via *Agrobacterium tumefaciens*.
- PCR analysis to confirm the presence of cryIA(c) gene in putative transgenic plants