

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

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.

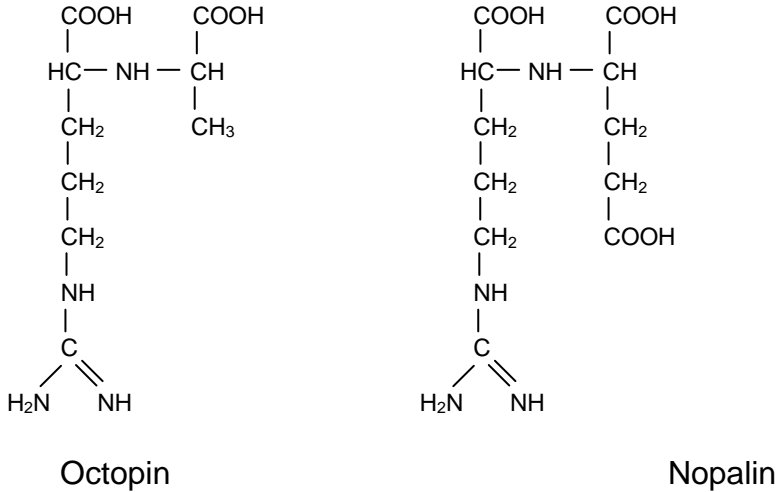
1.1.1. Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

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 α -cetoglutaraldehyd. Công thức cấu tạo của opine được trình bày ở hình 1.1.

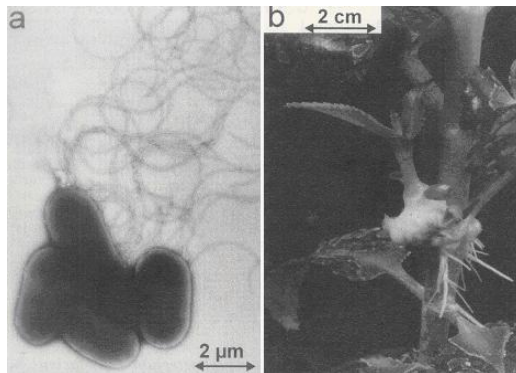
A. tumefaciens đã thực hiện “kỹ thuật gen” với mục đích tạo ra cây biến đổi gen có lợi cho nó. Như vậy, việc khẳng định kỹ thuật gen là một quá trình nhân tạo là không hoàn toàn đúng. Khả năng chuyển DNA của *A. tumefaciens* được ứng dụng trong công nghệ gen hiện đại. Để hiểu được quá

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



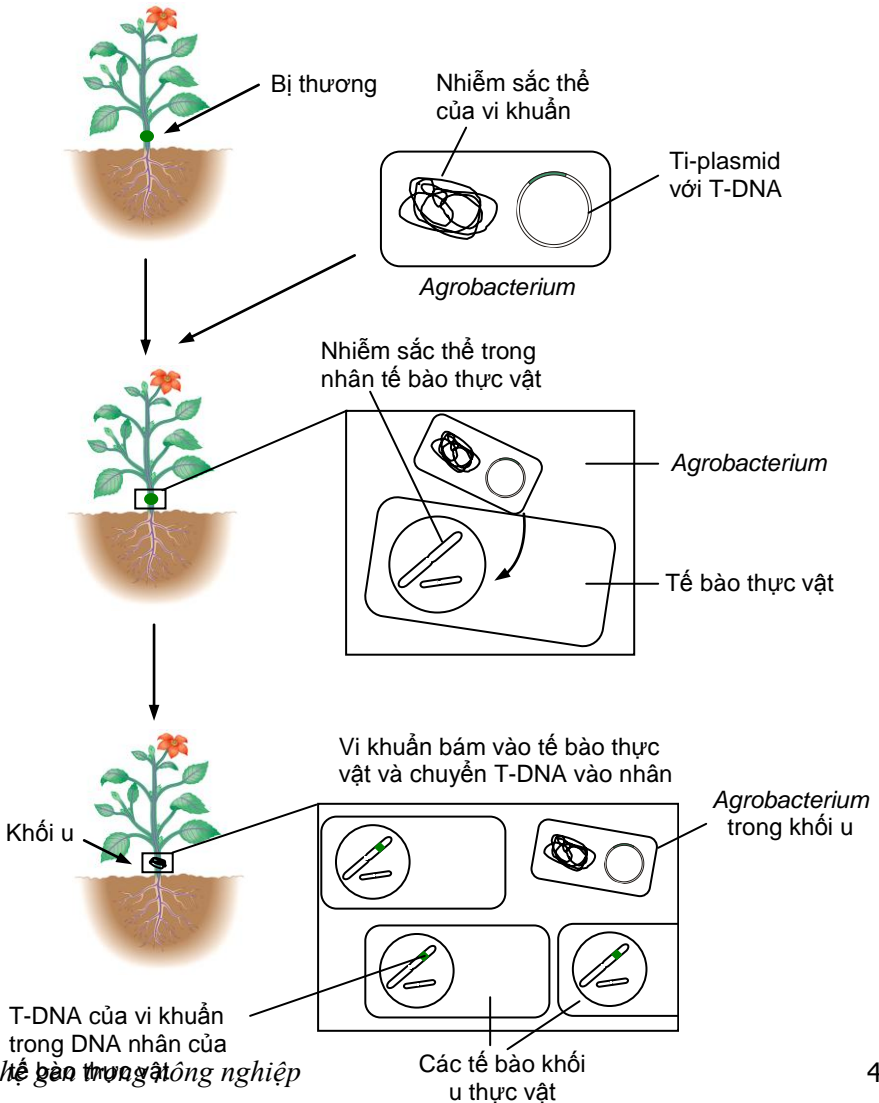
Hình 1.1. Công thức cấu tạo của opine.

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.

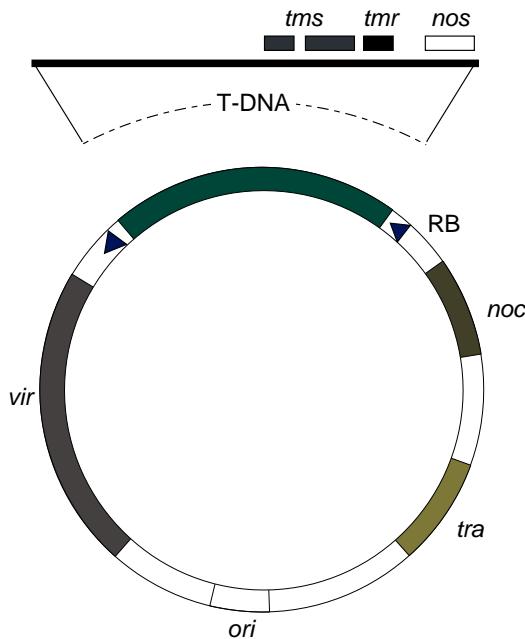
Ti-plasmid mang các gen mã hóa cho protein phân giải opine, nhận biết những tế bào thực vật bị thương, cắt và vận chuyển đoạn T-DNA (transfer-DNA). T-DNA là một phần của Ti-plasmid, được chuyển vào thực vật. Trên đó định vị những gen tạo khối u và tổng hợp opine. T-DNA được giới hạn bởi hai vùng, bờ 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).



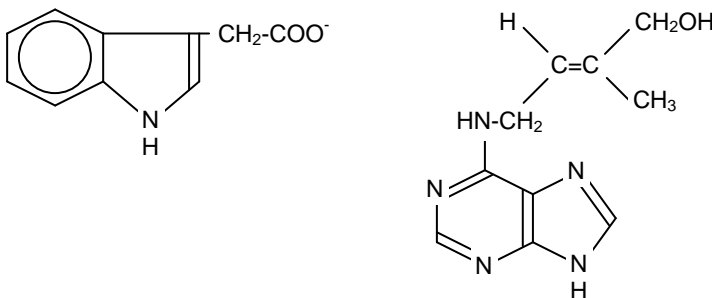
Hình 1.4. Ti-plasmid của *Agrobacterium* dạng nopalín. T-DNA: Transfer-DNA, LB: Bờ trái, RB: Bờ phải, *ori*: khởi đầu sao chép của *A. tumefaciens*. *noc*: Phân giải nopalín, *nos*: Tổng hợp nopalín. *tmr*: Tổng hợp cytokinin,

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*.

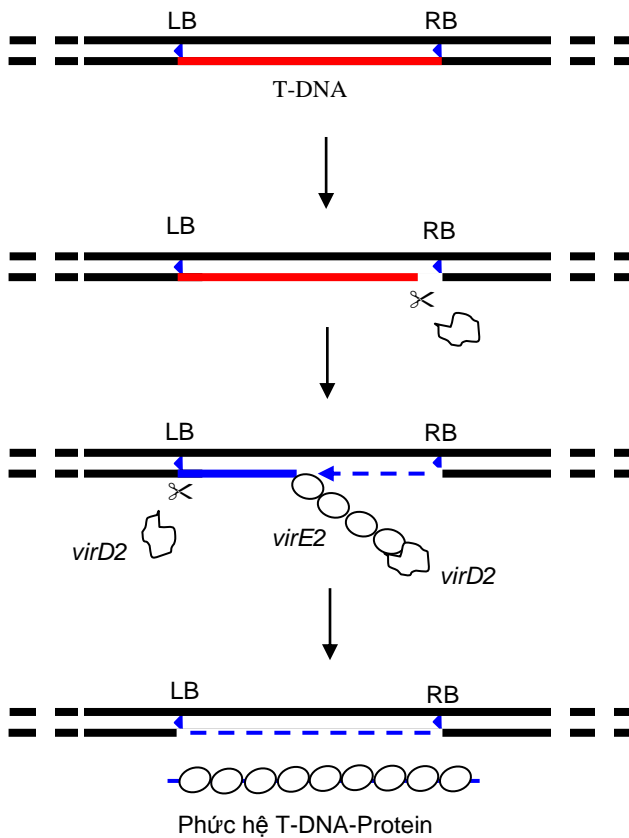
Khối u xuất hiện bởi những gen của *A. tumefaciens*

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.

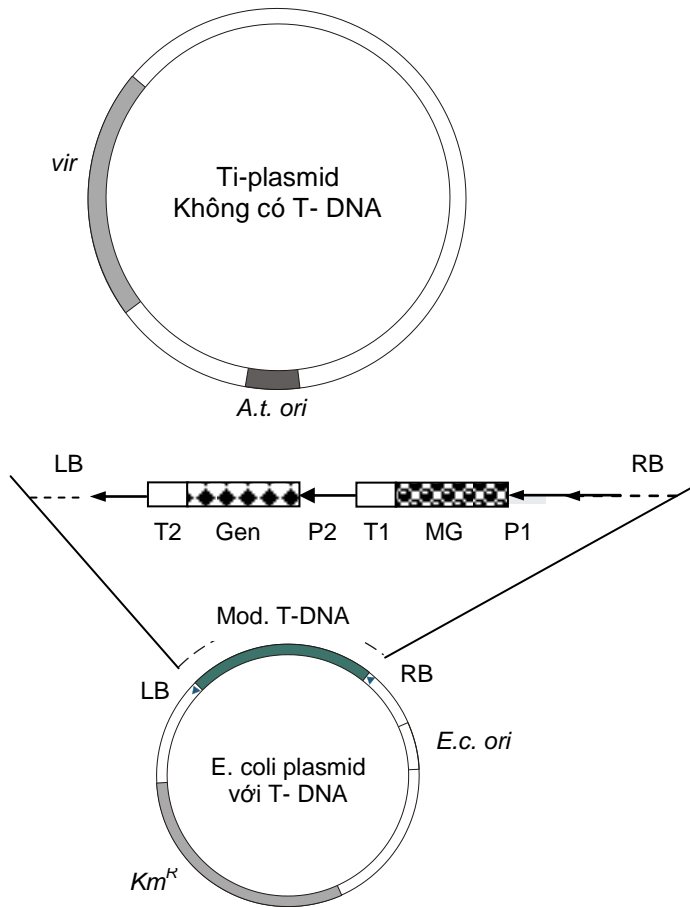
Người ta đã thành công trong việc sửa đổi Ti-plasmid và T-DNA để các phytohormone này không được tạo nên. Trong những bước tiếp theo gen tổng hợp opine được cắt ra và đưa vào những gen chỉ thị (xem mục 1.2), ví dụ: gen kháng kanamycin. Ngày nay, người ta sử dụng hệ thống được gọi là vector hai nguồn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

pháp thẩm qua, ở đây không chỉ là tế bào hoặc mô mà có thể cây hoàn chỉnh được sử dụng. Cây chưa nở hoa được ngâm từng phần vào dung dịch *A. tumefaciens*. Sau đó, sàng lọc thể hệ cây con của những cây được biến nạp này để xác định cây biến đổi gen. Dĩ nhiên, phương pháp này thích hợp chỉ với cây rất nhỏ có chu kỳ sống ngắn và có khả năng sản sinh ra lượng hạt lớn, vì hiệu quả của phương pháp này không cao.



Hình 1.7. Sơ đồ hệ thống vector hai nguồn để biến nạp bằng *A. tumefaciens*. Các gen tạo khối u và tổng hợp nopalín được loại ra, T-DNA mang một gen đánh dấu để chọn lọc trong thực vật (MG). Các gen khác được chèn vào. *A.t ori*: Khởi đầu sao chép để nhân lên trong *A. tumefaciens*, *E.c. ori*: Khởi đầu sao chép để nhân lên trong *E. coli*. *Km^R*: gen kháng

kanamycin để chọn lọc trong *E. coli* và *A. tumefaciens*. P1, P2: Promoter, T1, T2: Terminator, *vir*: Vùng *vir*.

Ý nghĩa của những gen *vir* ở sự chuyển *A. tumefaciens*-T-DNA được giải thích như sau:

Gen *virA* mã hóa cho một protein màng, là chất nhận hợp chất phenol ở tế bào cây bị thương. Sự nhận biết chất này dẫn đến sự hoạt hóa sản phẩm gen *virG*, đến lượt nó lại kích thích sự sao chép và sự biểu hiện của tất cả gen *vir*. Sự hoạt hóa của protein thuộc gen *virG* có thể do sự vận chuyển những nhóm phosphate (phosphoryl hóa). Hai protein được mã hóa từ gen *virD2* và *virE2* quan trọng đối với việc chuyển T-DNA. Protein *virD2* là một endonuclease, cắt sợi đơn đặc hiệu ở bờ phải và trái của T-DNA, Protein *virE2* gắn lập tức vào sợi đơn và ngăn cản sự gắn lại với Ti-plasmid (Hình 1.7). Sau đó, bằng cơ chế tổng hợp sửa chữa DNA, từ sợi đơn còn lại trong Ti-plasmid xuất hiện lại một T-DNA hoàn chỉnh. Ngoài ra, một protein *virD2* gắn vào đầu 5' của T-DNA sợi đơn đã được cắt ra bằng liên kết đồng hóa trị. Bằng cách này xuất hiện một phức hệ DNA-protein và được chuyển vào tế bào thực vật. Quá trình này xảy ra như thế nào vẫn chưa biết hết mọi chi tiết, nhưng có thể là 11 protein được mã hóa từ gen *virB* tạo nên một lỗ hồng, qua lỗ này phức hệ DNA-protein được vận chuyển vào thực vật.

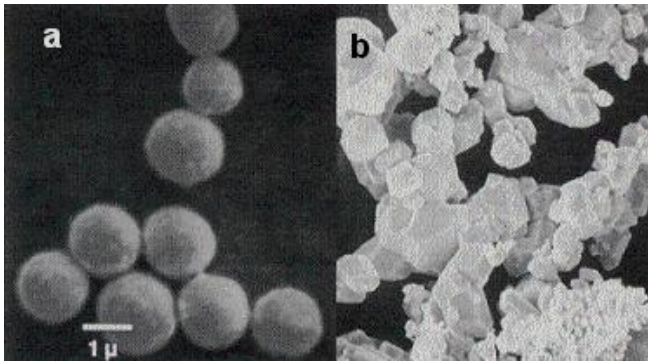
Khi đến tế bào thực vật phức hệ này đi vào nhân tế bào. Protein *virD2* và *virE2* chứa trình tự định vị nhân đặc hiệu cho phép phức hệ đi qua màng nhân và gắn vào DNA thực vật một cách ngẫu nhiên ở những chỗ gãy trên sợi của DNA của tế bào thực vật. Tuy nhiên, vị trí tái tổ hợp được quan sát là đặc hiệu, bao gồm những trình tự rất ngắn 5-10 bp. Quá trình kết hợp được thực hiện nhờ các enzyme thực vật, có thể có sự tham gia của protein *virD2*.

1.1.2. Chuyển gen bằng phương pháp phi sinh học

Biến nạp phi sinh học là một phương pháp rất có triển vọng ở thực vật, được phát triển năm 1987 bởi Sanford và cộng tác viên, đặc biệt ở cây ngũ cốc vì thường không thể biến nạp được bằng *A. tumefaciens* và sự tái sinh cây từ tế bào trần gặp khó khăn. Để vượt qua thành tế bào người ta thiết kế một dụng cụ để bắn những hạt wolfram hoặc vàng mang DNA vào tế

bào. Hạt này nhỏ đến nỗi khi đi vào tế bào nó không gây hại kéo dài (Hình 1.8). Ưu điểm của phương pháp này:

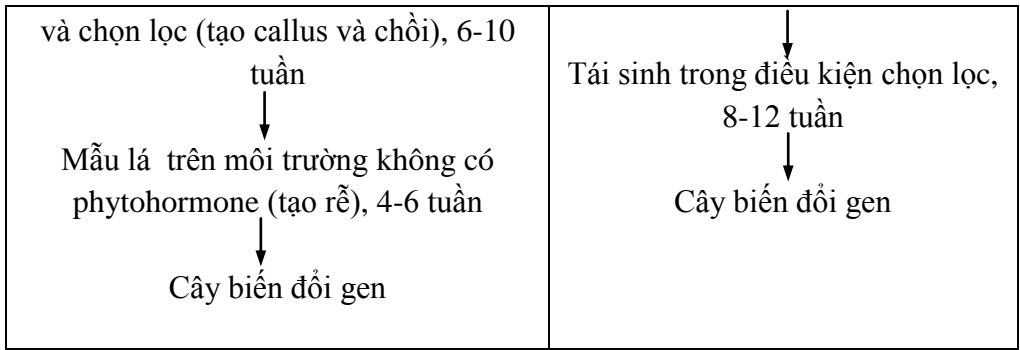
- Không cần phải phân hủy thành tế bào bằng enzyme.
- Về lý thuyết mọi tế bào và mô đều có thể được biến nạp.
- Không phức tạp như ở sự biến nạp *A. tumefaciens*. Sự so sánh hai phương pháp trình bày ở bảng 1.2.



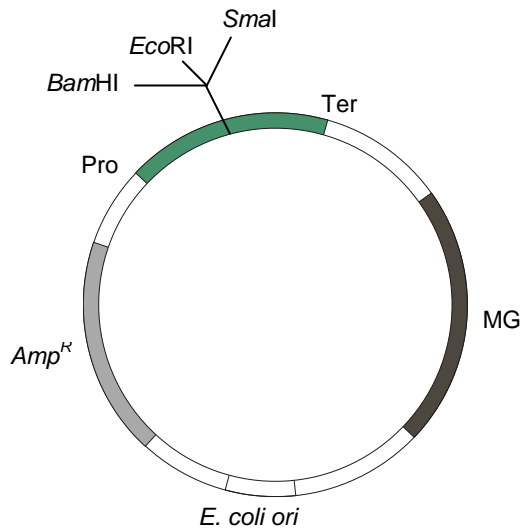
Hình 1.8. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử của hạt vàng (a) và wolfram (b) trong cùng tỷ lệ cho sự biến nạp phi sinh học.

Bảng 1.2. So sánh biến nạp bằng *A. tumefaciens* và phi sinh học.

Biến nạp nhờ <i>A. tumefaciens</i> vào mảnh lá	Biến nạp phi sinh học vào callus
<p>Các mảnh lá được nuôi cấy chung với vi khuẩn, 1-2 ngày</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Các mẫu lá phát triển</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Xử lý kháng sinh để diệt vi khuẩn và chọn lọc các tế bào thực vật biến nạp, 2-4 tuần</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Chuyển mẫu lá lên môi trường tái sinh</p>	<p>Tạo callus hoặc phôi vô tính, 8-12 tuần</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Biến nạp phi sinh học</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Phát triển callus không chọn lọc, 4 ngày</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Callus phát triển trong điều kiện chọn lọc, 8-12 tuần</p>



Vector sử dụng cho biến nạp phi sinh học đơn giản hơn vector biến nạp bằng *A. tumefaciens* (Hình 1.9).



Hình 1.9. Vector sử dụng cho biến nạp phi sinh học. Trên cơ sở một vector của *E. coli*, một Makergen (không trình bày promoter và terminator) để chọn lọc thực vật. Ngoài ra, còn có một vị trí tạo dòng giữa một promoter và một terminator đặc hiệu cho thực vật để chèn gen ngoại lai vào, *Amp^R*: gen kháng ampicillin.

Phương pháp này đã thành công trong việc đưa 10 gen đồng thời vào các plasmid khác nhau và có thể được sử dụng cho bất cứ loài sinh vật nào, ví dụ vi khuẩn, nấm, tảo và động vật.

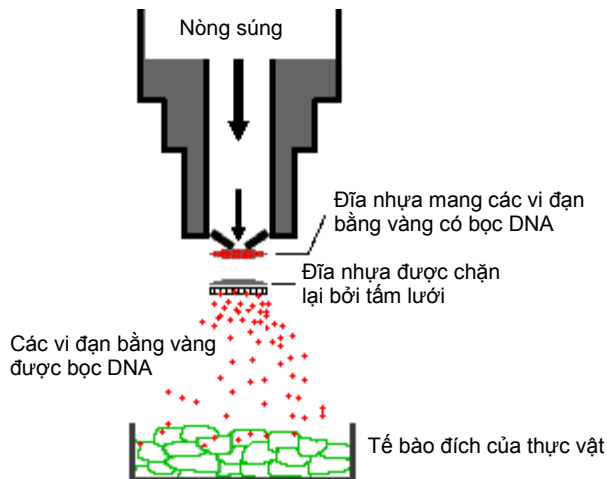
Trong khi các phương pháp khác chỉ phù hợp với việc đưa gen lạ vào nhiễm sắc thể của nhân thì bằng phương pháp này người ta có thể biến nạp

cả ty thể và Lạp thể (Bảng 1.3). Năm 1988, đã biến nạp thành công ty thể của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và ty thể của tảo xanh *Chlamydomonas*.

Thiết bị đầu tiên để chuyển gen là súng bắn gen. Máy hiện đại sử dụng khí helium nén làm đạt đến vận tốc bắn tối ưu và thao tác an toàn (Hình 1.10). Tốc độ bắn đạt 1300 m/s (so sánh với vận tốc âm thanh trong không khí 343 m/s). Tỷ lệ biến nạp hoặc hiệu quả của phương pháp phụ thuộc vào nhiều yếu tố: lượng DNA/hạt vàng hoặc wolfram, tốc độ hạt, số lượng hạt, độ lớn và loại tế bào và mật độ của tế bào hoặc mô được sử dụng.

Bảng 1.3. Một số gen đã được chuyển vào ty thể của thực vật bậc cao.

Gen biến nạp	Chức năng
Gen δ -endotoxin của <i>Bacillus thuringiensis</i>	Kháng côn trùng
5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthase	Kháng glyphosate-(Round up)
β -Glucuronidase	Gen chỉ thị (phản ứng tạo màu)
Neomycin-phosphotransferase	Kháng kanamycin



Hình 1.10. Sơ đồ súng bắn gen (gene gun, bombardment).

Biến nạp phi sinh học chỉ mới đạt được sự biểu hiện tạm thời (transient) của các gen ở hành, đậu tương, lúa và ngô. Sự biểu hiện tạm thời có nghĩa là gen biến nạp ban đầu hoạt động nhất thời và sau đó thì mất hoặc sự biểu hiện bị cản trở bởi sự methyl hóa DNA sau phiên mã. Chỉ một số ít biến nạp bền vững được mô tả và thực tế phương pháp này có ý nghĩa lớn đối với cây ngũ cốc. Tuy nhiên vẫn còn một số khó khăn:

Hiệu quả của phương pháp này thấp, chỉ khoảng 0,05% đỉnh sinh trưởng đậu tương tái sinh sau khi biến nạp.

+

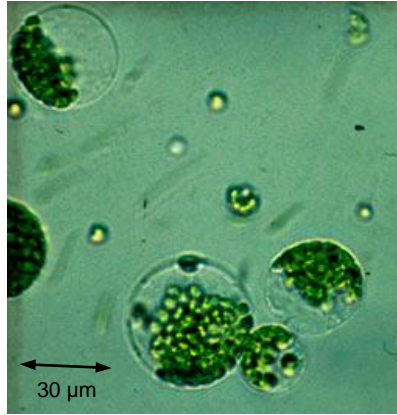
DNA biến nạp không phải luôn luôn bền vững trong DNA của nhân tế bào nên thường biểu hiện tạm thời. Thường chỉ một số ít tế bào của mô được biến nạp và vì vậy không phải lúc nào cũng tái sinh được cây thay đổi gen đồng nhất.

+ Phần lớn phải sử dụng mô phân sinh để biến nạp, ví dụ phôi lúa hoặc dung dịch tế bào ngô.

1.1.3. Chuyển gen bằng tế bào trần

Trừ tảo là sinh vật đơn bào, tế bào thực vật tồn tại ở dạng mô. Sự gắn giữ các tế bào thực hiện qua carbohydrate cao phân tử là pectin. Chúng tạo nên những cái gọi là lá mỏng trung tâm gắn các tế bào lân cận lại với nhau.

Để tạo nên tế bào trần từ những mô lá trước hết cần phải phân giải pectin nhờ enzyme pectinase. Bước tiếp theo thành tế bào, phần lớn gồm cellulose, phải được phân giải nhờ enzyme cellulase. Kết quả xuất hiện tế bào tròn, không có thành (Hình 1.11), để bền vững chúng phải được giữ trong một dung dịch đồng thẩm thấu.



Hình 1.11. Tế bào trần cây thuốc lá dưới kính hiển vi.

Vector được sử dụng cho biến nạp tế bào trần giống như vector của biến nạp phi sinh học (Hình 1.9). DNA được biến nạp vào tế bào trần có thể thực hiện bằng hai cách:

+ Thứ nhất, sử dụng chất polyethyleneglycol, khi có mặt chất này các tế bào trần hòa lẫn vào với nhau và qua đó các phân tử DNA được tiếp nhận.

+ Thứ hai, sự biến nạp được thực hiện bằng sốc điện, gọi là xung điện. Sốc điện dẫn đến sự không phân cực ngắn của màng tế bào trần, qua đó DNA được tiếp nhận. DNA đi vào nhân và kết hợp hoàn toàn ngẫu nhiên vào một vị trí bất kỳ vào DNA nhân của thực vật.

Về nguyên tắc bất kỳ thực vật nào cũng có thể được biến nạp bằng các phương pháp trên. Tuy nhiên việc tái sinh cây hoàn chỉnh thường là khó khăn, vì vậy việc sử dụng biến nạp bằng tế bào trần bị hạn chế.

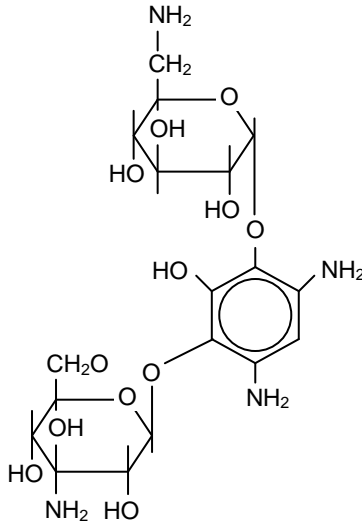
1.2. Hệ thống chọn lọc và chỉ thị

Nói chung, ở tất cả các hệ thống biến nạp tỷ lệ cây tiếp nhận DNA bền vững là rất thấp. Vì vậy, người ta phải có phương pháp để phân biệt một số rất ít cây biến nạp từ một lượng lớn cây không biến nạp. Để xác định những cây được biến nạp người ta sử dụng hệ thống gen chọn lọc. Đặc biệt ưa thích là hệ thống chọn lọc trội, có nghĩa là chỉ những cây biến đổi gen có thể tái sinh và phát triển. Ngược lại, ở một hệ thống chỉ thị đơn giản như hệ thống chỉ thị GUS, thì cả những cây không biến nạp cũng tái sinh. Dĩ nhiên

phương pháp này không hiệu quả, vì luôn luôn chỉ có một phần nhỏ tế bào thực vật được biến nạp. Một ưu điểm thứ hai quan trọng hơn là thao tác của hệ thống chọn lọc đơn giản để có thể phân tích nhanh một số lượng cây lớn.

Trong nhiều trường hợp người ta sử dụng kháng sinh kanamycin cho chọn lọc trội. Tuy nhiên, ở nồng độ cao nó độc đối với phần lớn thực vật. Điển hình cho kháng sinh nhóm này là một aminoalcohol gắn với gốc đường chứa nhóm amine (Hình 1.12). Bên cạnh kanamycin thu được từ *Streptomyces kanamyceticus* còn có gentamycin (từ *Micromonospora purpurea*), neomycin (từ *Streptomyces fradiae*) và streptomycin (từ *Streptomyces griseus*) cũng thuộc nhóm này.

Người ta sử dụng các gen kháng khác, ví dụ gen neomycin-phosphotransferase (*nptII*) mã hóa cho phosphotransferase, sản phẩm gen làm bất hoạt kháng sinh aminoglycosid (ví dụ: kanamycin) do gắn thêm nhóm phosphate (phosphoryl hóa). Gen mã hóa cho neomycin-phosphotransferase có nguồn gốc từ vi khuẩn và thường không có trong thực vật. Với những promoter và terminator tương ứng, gen này có thể được sử dụng trong thực vật.



Hình 1.12. Công thức cấu tạo của kanamycin.

Bên cạnh gen kháng kanamycin cũng có một loạt các hệ thống chọn lọc khác được sử dụng và giới thiệu ở bảng 1.3. Các gen kháng trội, ngoài

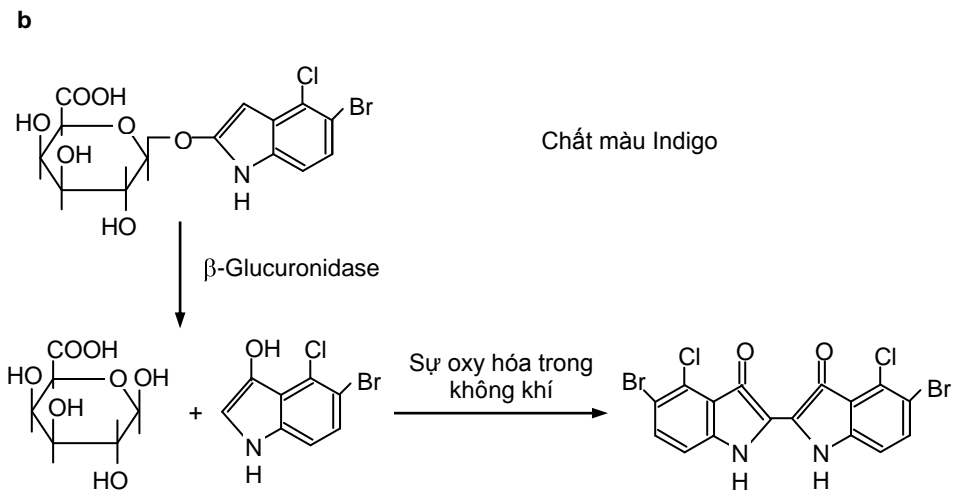
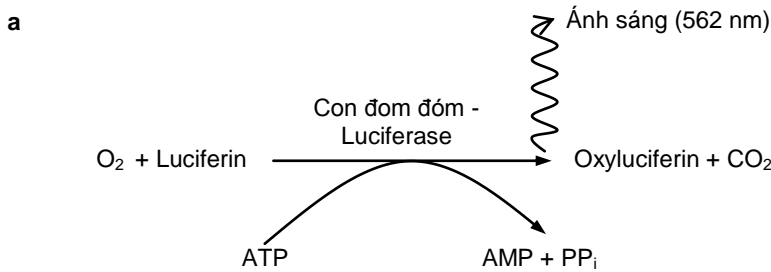
neomycin phosphotransferase, còn có hygromycin B phospho-transferase và 3-enolpyruvyl shikimate 5-phosphatsynthetase (EPSP-synthetase).

Ngoài các gen chọn lọc, còn các gen chỉ thị (reporter gene) cũng được sử dụng để chọn lọc thể biến nạp. Gen chỉ thị không chọn lọc trội, nhưng sản phẩm gen được chứng minh dễ dàng bằng phương pháp hóa sinh, hóa học mô, kính hiển vi hoặc quang kế. Ví dụ: người ta có thể chứng minh chức năng của promoter đặc hiệu mô cũng như sự biến nạp của những loại tế bào nhất định hoặc để kiểm tra một gen xác định có hoạt động hay không. Trong thực vật bậc cao được sử dụng nhiều nhất là β -D-glucuronidase, luciferase và mới đây là green fluorescent protein (GFP). Việc xác nhận được thực hiện nhờ sự biến đổi của một chất đặc hiệu (glucuronid hoặc luciferin, hình 1.13) và sự phát hiện ra sản phẩm xúc tác hoặc quang tử trong trường hợp luciferase. Ngược lại ở GTP-protein có thể chứng minh được bằng kính hiển vi huỳnh quang của protein sau khi kích thích với ánh sáng có độ dài bước sóng phù hợp. Ở phương pháp này không cần một cơ chất đặc hiệu.

Bảng 1.4. Hệ thống gen chọn lọc và chỉ thị cho thực vật.

Hoạt tính enzyme	Chọn lọc tính trội	Xác nhận đơn giản
3-Enolpyruvylshikimate-5-phosphatsynthase	Có	Không
Acetollactatsynthase	Có	Không
Luciferase của vi khuẩn	Không	Có
Bromxynilnitrilase	Có	Không
Chloramphenicol-acetyltransferase	Có	Có
Dihydro-folatreductase (Tetrahydrofolate-dehydrogenase)	Có	Có
Gentamycin-acetyltransferase	Có	Có
Green fluorescent protein	Không	Có
Hygromycin-phosphotransferase	Có	Có

Luciferase của côn trùng chiếu sáng	Có	Có
Neomycin-phosphotransferase (Kanamycinkinase)	Không	Có
Nopalinsynthase	Không	Có
Octopinsynthase	Có	Có
Phosphinothricin-acetyltransferase	Không	Có
β -D-glucuronidase	Có	Có
Streptomycin-phosphotransferase	Có	Có
Threonindehydratase	Có	Có



Hình 1.13. Xác nhận sự biểu hiện gen chỉ thị. a: Xác nhận sự biểu hiện của luciferase, cơ chất là luciferin, phản ứng này phụ thuộc vào ATP. Ánh sáng tạo nên từ phản ứng được định lượng bằng máy. **b:** Xác nhận sự biểu hiện của β -D-glucuronidase, cơ chất nhân tạo là 5-bromo-4-chlor-3-indoyl- β -glucuronid (X-GlcA), chất này được thủy phân nhờ glucuronidase. Bằng sự oxy hóa xuất hiện một chất indigo màu xanh. Người ta có thể sử dụng các chất khác thay thế X-Glc, mà sản phẩm thủy phân là chất màu phát quang.

1.3. Tái sinh cây hoàn chỉnh

So sánh với sinh vật đơn bào như vi khuẩn, nấm men hoặc tảo thì sự biến nạp vào thực vật bậc cao khó khăn hơn, vì không chỉ phải đưa DNA vào trong tế bào mà còn phải tái sinh cây hoàn chỉnh từ một tế bào hoặc mô phân lập. Điều này thực hiện được vì phần lớn tế bào thực vật có tính toàn năng và mỗi tế bào có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh (Hình 1.14). Khác với động vật, thực vật có thể tái sinh từ tế bào soma bình thường và từ đó thu được trực tiếp hạt biến đổi gen. Tuy nhiên, không phải tất cả các loại tế bào và mô đều phù hợp cho mục đích này. Vì vậy, ở thực vật phải thử nghiệm nhiều để tìm ra nguyên liệu sử dụng ban đầu phù hợp. Điều quan trọng là tìm ra môi trường phù hợp để kích thích tế bào phân chia. Bên cạnh những chất khoáng vô cơ, cần cả những chất hữu cơ khác nhau, đặc biệt đường là nguồn carbon và năng lượng, và các chất điều hoà sinh trưởng. Auxin và cytokinin có ý nghĩa lớn trong nuôi cấy mô và tế bào. Đôi khi amino acid hoặc nước dừa cũng được sử dụng. Cũng như ở trong cây tác dụng của phytohormone phức tạp và chức năng rất đặc hiệu. Tuy nhiên có thể nói rằng, lượng cytokinin cao kích thích sự tạo chồi, nồng độ auxin cao, phụ thuộc với hàm lượng cytokinin, kích thích tạo callus hoặc rễ. Callus là một khối tế bào không màu, có kích thước lớn, không phân hóa và chứa không bào. Khi bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy callus thì sự phát triển chồi và rễ được kích thích trở lại. Điều kiện chính xác cho sự tái sinh thành công phải được thử nghiệm cho từng loài cây. Ví dụ: để tạo callus và chồi từ mảnh lá thuốc lá thì cần bổ sung 0,2 mg/l α -NAA và 1,0 mg/l BAP (Hình 1.14).

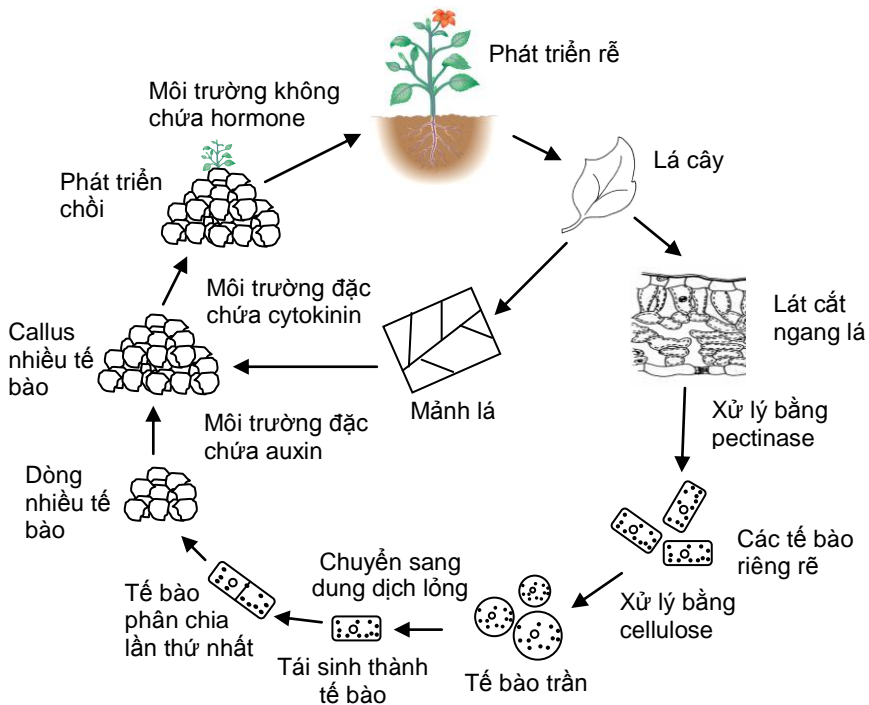
Từ tế bào trần có thể tái sinh cây hoàn chỉnh, nếu thành công ở bước tạo thành tế bào và phân chia tế bào. Tuy nhiên, ở nhiều thực vật quá trình

tái sinh này rất khó khăn. Dĩ nhiên, ở cây tái sinh có sự biến đổi lớn về kiểu hình và nguyên nhân là do sự bất thường ở phân bào nguyên nhiễm và đột biến, được gọi là biến dị soma.

Như đã nêu không phải tất cả thực vật được tái sinh dễ dàng từ tế bào trần, tế bào hoặc mô. Những loài đại diện của họ cà, cây cải cay, cam, táo và cà rốt tái sinh dễ dàng. Ở những thực vật khác rất hiếm hoặc chỉ thành công với một số giống nhất định (như củ cải đường). Đặc biệt khó khăn là các cây ngũ cốc. Trong thực tế các thí nghiệm biến nạp, sự tái sinh và sự chọn lọc thường được tiến hành đồng thời.

1.4. Xác nhận sự thay đổi gen

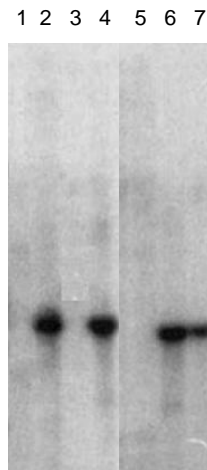
Thực tế là một cây sau khi biến nạp sinh trưởng trên môi trường chọn lọc thì chưa đủ cơ sở để nói là một biến nạp thành công, vì có thể là tính kháng xuất hiện tự nhiên do một đột biến trong vật chất di truyền của thực vật. Hơn nữa tỷ lệ biến nạp thấp, nằm trong độ lớn của đột biến tự nhiên với tần suất 10^{-6} đến 10^{-8} . Vì vậy phải thực hiện các thí nghiệm bổ sung, như Southern blot hoặc PCR và các thí nghiệm khác để chứng minh sản phẩm của gen.



Hình 1.14. Sơ đồ biểu diễn tạo tế bào trần và tái sinh cây hoàn chỉnh.

Những sinh vật biến đổi gen được chứng minh bằng việc phân tích thành phần các chất được thay đổi, đặc biệt là những đặc tính (ví dụ: kháng một tác nhân gây bệnh nào đó), những protein thay đổi, xuất hiện protein mới và bằng việc xác định DNA lạ được biến nạp.

Để chứng minh DNA được biến nạp vào thực vật phương pháp Southern và PCR được sử dụng vì hai phương pháp này rất nhạy cảm. Ở quá trình tạo cây biến đổi gen, từng bước cần phải chứng minh, rằng tế bào và thực vật này được biến nạp. Phản ứng lai Southern blot được ưa thích, vì nó ít nhạy cảm với sự lẫn tạp của DNA khác và đồng thời người ta nhận được thông tin về số lượng copy, nghĩa là số lượng phân tử DNA ngoại lai được gắn vào hệ gen. Để thực hiện phương pháp này chỉ cần vài μg DNA ($1 \mu\text{g} = 1/1000 \text{ mg}$), mà người ta dễ dàng tách ra từ một lá cây duy nhất. Một ví dụ chứng minh cho DNA biến nạp đưa ra ở hình 1.15.

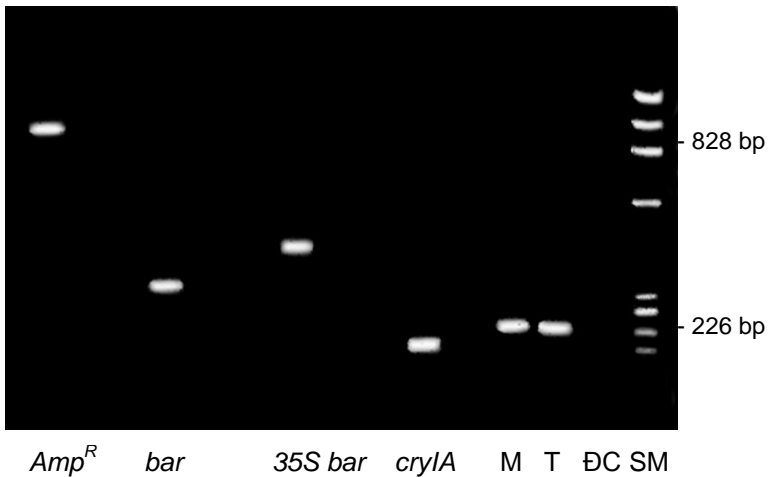


Hình 1.15. Phóng xạ tự ghi kết quả lai Southern. Sinh vật biến đổi gen được cắt bằng một enzyme giới hạn *XhoI* và các đoạn DNA được tách ra bằng điện di. Sau đó thực hiện Southern blot và lai với mẫu dò là DNA đánh dấu phóng xạ. Các đường 1, 3 và 5: các nguyên liệu không biến nạp.

Mẫu ở các giếng 2, 4, 6 và 7: thể hiện các sinh vật biến đổi gen, vì ở đây xuất hiện tín hiệu lai rõ rệt.

Khi có nhiều mẫu khác nhau và có một lượng rất ít DNA, thậm chí DNA từ những thực phẩm được biến đổi gen như chip khoai tây được phân lập, thì khuếch đại PCR là phương pháp được lựa chọn. Phương pháp này đặc biệt phù hợp cho mục đích kiểm tra và xác định những thay đổi gen ở cây trồng và thực phẩm.

Sự chứng minh DNA trong sản phẩm cây trồng thành công hay không, phụ thuộc vào phương pháp sử dụng. Ví dụ: có thể xác định DNA trong sản phẩm khoai tây đông lạnh, nhưng ở trong dầu đậu tương thì hầu như không có DNA.



Hình 1.16. Xác nhận thay đổi gen ở ngô biến đổi gen. Agarose gel với các đoạn DNA được phân tách sau khi thực hiện phản ứng PCR. Năm cặp primer được sử dụng (*Amp^R*: gen kháng ampicillin, *bar*: kháng thuốc diệt cỏ, *35S bar*: promoter và kháng thuốc diệt cỏ, *cryIA*: gen tạo độc tố ở *Bt. ivrl*: gen mã hóa invertase ở ngô). M: DNA từ ngô bình thường, T: DNA từ ngô biến đổi gen. Bên phải là marker chuẩn (SM) để xác định kích thước của các đoạn PCR.

Một ví dụ về sử dụng PCR để xác định cây biến đổi gen trong minh họa ở hình 1.16. Từ thí nghiệm trên có thể rút ra những kết luận sau:

+ Đối chứng (không biến nạp gen) không có băng DNA. Có nghĩa là thí nghiệm được thực hiện chính xác.

+ Gen mã hóa cho invertase (*ivr1*) có trong tất cả các giống ngô tự nhiên vì thế có thể tìm thấy cả trong ngô không biến đổi gen (M) lẫn ngô biến đổi gen (T) nhờ cặp primer đặc hiệu của gen *ivr1*. Điều đó có nghĩa là DNA đã tồn tại ở cả hai loại ngô.

+ Với sự tham gia của 4 cặp primer (oligonucleotide) khác chúng đã khuếch đại những đoạn khác nhau của vector, một đoạn DNA được tạo ra chỉ ở ngô biến đổi gen (chỉ có T). Điều đó có nghĩa là cặp nucleotide đặc hiệu với DNA biến nạp và qua đó cho phép xác định chắc chắn giống ngô biến đổi gen.

Nói chung, phản ứng lai DNA và khuếch đại PCR đòi hỏi phải có những thông tin nhất định về DNA được biến nạp, vì thế cần có những mẫu dò hoặc những nucleotide đặc hiệu.

Một phương pháp khác là sự biểu hiện của gen chỉ thị, sản phẩm của nó dễ dàng được chứng minh. Tuy nhiên, phương pháp này thường được sử dụng cho mục đích nghiên cứu. Ở đây, người ta sử dụng vector biểu hiện β -D-glucuronidase, hoạt động của nó được chứng minh dễ dàng bằng sự tạo nên một chất indigo màu xanh (Hình 1.13).

Sự xác nhận di truyền của gen biến nạp ở các thế hệ sau được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, tuy nhiên vấn đề này cũng gặp nhiều khó khăn nhất là đối với các được chuyển gen có vòng đời dài (cây lâu năm). Mặc dù vậy yêu cầu này là cần thiết, vì ở thế hệ sau của cây biến nạp có thể xảy ra sự bất hoạt gen biến nạp.

Cũng có các phương pháp chứng minh sự có mặt của protein đặc hiệu trong cây biến đổi gen. Đối với đậu tương biến đổi gen công ty Strategic Diagnostic Inc hợp tác với công ty Monsanto sản xuất ra bột hóa chất chuẩn GMO Soya Test KitTM; với kháng thể đặc hiệu, protein EPSP-synthetase được chứng minh là có mặt trong đậu tương biến đổi gen.

1.5. Biểu hiện của DNA ngoại lai

Thực vật bậc cao có ba cơ quan (rễ, chồi và lá) và một số mô đặc hiệu như mô bảo vệ (ví dụ biểu bì), mô duy trì (ví dụ mô phân sinh) hoặc mô dày (collenchym). Ngoài ra còn có hơn một trăm loại tế bào khác nhau. Một gen lạ có thể biểu hiện trong tất cả tế bào (DNA lạ biến nạp vào nhiều vị trí khác nhau trong hệ gen) hoặc chỉ trong một số loại tế bào hoặc mô nhất định. Ở đây, người ta sử dụng những trình tự khởi động phiên mã được gọi là promoter. Mỗi một gen được một promoter điều khiển sự biểu hiện của gen. Trong khi một số promoter hoạt động trong phần lớn các tế bào, một số khác có tính chuyên hóa rất cao đối với những loại tế bào nhất định (Bảng 1.4).

Trong tế bào có nhiều cơ quan như nhân, ty thể, lục lạp... Nhờ những promoter thích hợp mà gen biến nạp biểu hiện ở vị trí chính xác như mong muốn.

Ngoài ra, sự biểu hiện antisense cũng được đề cập, với phương pháp này sự biểu hiện của từng gen riêng lẻ có thể bị ức chế.

Bảng 1.5. Một số promoter đặc hiệu cho mô và tế bào thực vật.

Loại tế bào hoặc mô	Promoter/tên gen	Thực vật
Phloem ở lá và rễ	Asus1	<i>Arabidopsis</i>
Hoa và đầu rễ	CHS15	Đậu
Mô phân sinh	Cyc07	<i>Arabidopsis</i>
Tế bào kèm của khí khổng	Đoạn 0,3 kp của	Khoai tây
Phloem	AGPase	Lúa
Hạt phấn	Đoạn của RTBV	Thuốc lá
Giao tử đực	PLAT4912	Lúa mì
Tế bào tapetum	Puroindolin-b	Thuốc lá
	TA29	

1.5.1. Biểu hiện gen ngoại lai ở nhiều vị trí

Trong thực tế phần lớn promoter 35S từ virus khảm hoa súp- lơ (cauliflower mosaic virus, viết tắt CaMV 35S) được sử dụng cho sự biểu

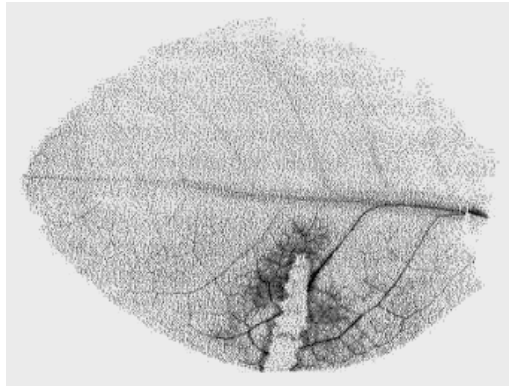
hiện của gen biến nạp trong tất cả các loại mô và tế bào. Promoter có nguồn gốc virus nên có hiệu quả phiên mã gen sau khởi động. Promoter CaMV 35S đặc biệt phù hợp cho sự biểu hiện của gen đánh dấu và gen chỉ thị hoặc tạo nên cây kháng thuốc diệt cỏ. Tuy nhiên, để nghiên cứu chức năng trao đổi chất của thực vật thì promoter này không phù hợp, vì sự thay đổi đường hướng trao đổi chất nhất định đòi hỏi sự biểu hiện gen ở tế bào hoặc mô đặc hiệu.

1.5.2. Biểu hiện gen ở tế bào hoặc mô đặc hiệu

Trong thực vật nhiều quá trình trao đổi chất chỉ xảy ra ở một vị trí nhất định, nên việc vận chuyển các chất giữa cơ quan sử dụng và cơ quan sản xuất là cần thiết. Sản phẩm quang hợp được tạo ra phần lớn ở lá xanh (nguồn) và phải được vận chuyển qua phloem của bó mạch đến các cơ quan sử dụng như hoa và rễ (đích). Ví dụ này làm rõ sự cần thiết cho sự biểu hiện của gen biến nạp. Trong những năm qua, nhiều promoter được phát hiện để tăng cường sự biểu hiện của gen. Những gen biến nạp được biểu hiện đặc hiệu ở củ khoai tây, trong lá hoặc thậm chí trong những tế bào riêng lẻ như hạt phấn.

Các promoter đặc hiệu được xác định qua thực nghiệm bằng cách phân lập các phân tử RNA chỉ tồn tại ở trong mô mong muốn. Tiếp theo là các gen và promoter được xác định. Tính đặc hiệu của một promoter được kiểm tra bằng các gen chỉ thị. Ở đây promoter được tạo dòng trước gen chỉ thị và được biến nạp vào thực vật, sau đó vị trí biểu hiện của gen đã được chứng minh, ví dụ hình 1.17.

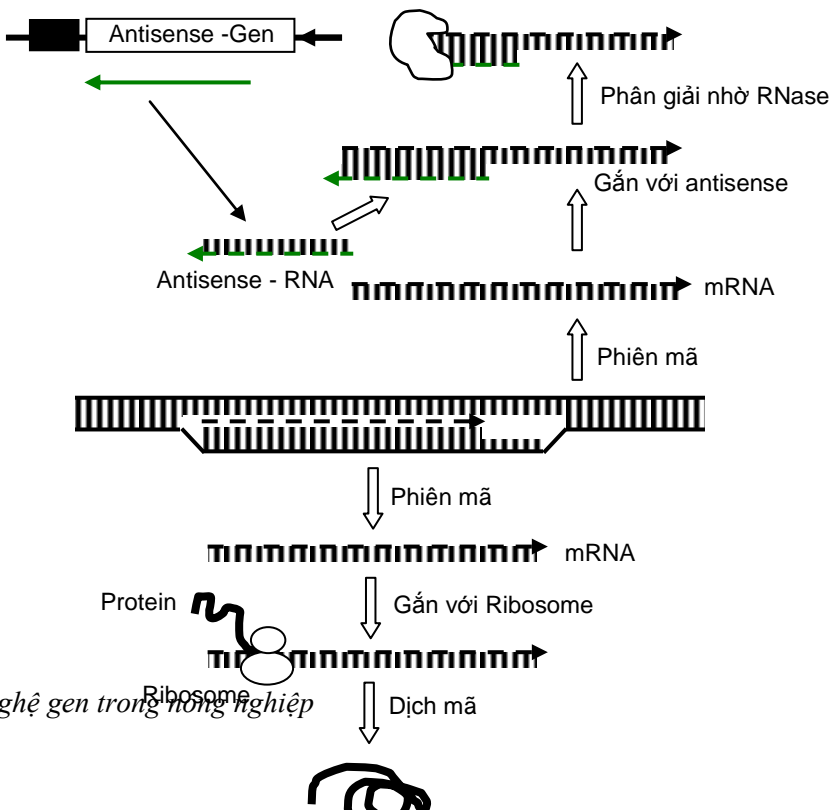
Chắc chắn trong những năm tới nhiều promoter đặc hiệu khác sẽ được xác định bằng những dự án xác định trình tự genome, như vậy trong thời gian không xa những promoter đặc hiệu sẽ được sử dụng cho tất cả các loại tế bào và loại mô.



Hình 1.17. Xác định sự biểu hiện gen nhờ gen chỉ thị. Sự biểu hiện của β -glucuronidase (vùng tối) dưới sự điều khiển của một promoter tương ứng chỉ thể hiện ở vùng lá bị thương.

1.5.3. Biểu hiện antisense

Năm 1988, lần đầu tiên người ta nhận thấy ở thực vật một sắc tố của hoa đã bị ức chế do sự biểu hiện của một RNA antisense. Phương pháp này có giá trị lớn không những đối với nghiên cứu cơ bản mà còn đối với ứng dụng.



Hình 1.18. Ảnh hưởng của antisense-RNA. Ở giữa là phân tử DNA, làm khuôn mẫu để tổng hợp mRNA. Ở phần dưới là sự biểu hiện gen bình thường. mRNA gắn vào ribosome và sự dịch mã được thực hiện tạo nên một polypeptide. Phần trên của sơ đồ xảy ra ở thực vật biến đổi gen, một gen được biến nạp để tạo nên một antisense-RNA (màu xanh), nó có thể kết hợp với mRNA nội sinh, làm xuất hiện một phân tử RNA mạch kép. Phân tử này được phân giải nhờ một enzyme đặc biệt. P: promoter, T: terminator.

Phương pháp antisense (Hình 1.18) dựa trên sự biểu hiện của phân tử RNA, bổ sung với sản phẩm phiên mã của một gen, làm cho mRNA bất hoạt và không thể dịch mã cho protein. Từ một RNA bổ sung chúng có thể tạo nên mạch kép. Mạch kép RNA được phân giải rất hiệu quả bằng một số enzyme xác định tương tự RNase H của retrovirus, qua đó sự phiên mã và tổng hợp protein bị đình trệ. Khi RNA tổng hợp tồn tại với một lượng lớn hơn sản phẩm phiên mã bình thường thì sự biểu hiện của gen này bị giảm rất mạnh hoặc đình chỉ hoàn toàn. Một ứng dụng nổi tiếng của phương pháp antisense là tạo ra cà chua FlavrSaver.

Trong lĩnh vực sử dụng thực vật biến đổi gen làm thực phẩm thì phương pháp antisense có một ưu điểm lớn về sự an toàn, vì không có protein ngoại lai được tạo ra trong tế bào mà chỉ có một phân tử RNA nhỏ. Điều này hoàn toàn tin tưởng, vì con người hằng ngày tiếp nhận một lượng rất lớn RNA không có hại cùng với thực phẩm.

1.5.4. Sự bền vững của cây chuyển gen

Để tạo nên những dòng thực vật biến đổi gen thì sự biểu hiện bền vững của gen biến nạp và sự truyền lại cho thế hệ sau có ý nghĩa lớn. Điều này nói lên rằng, độ bền vững của một gen biến nạp và sự biểu hiện của nó

không phải luôn luôn chắc chắn mà nó có thể thay đổi, vì thực vật có cơ chế làm bất hoạt những DNA ngoại lai.

Gần đây một số cơ chế bất hoạt gen biến nạp đã được xác định và sẽ được đề cập dưới đây vì nó ý nghĩa lớn đối với việc tạo ra thực vật biến nạp gen bền vững.

1.5.5. Sự bất hoạt do methyl hóa

Thường sự bất hoạt gen biến nạp do sự methyl hóa xảy ra mạnh mẽ, gây ra do sự tồn tại nhiều bản sao của một gen hoặc allele. Đặc biệt sự tồn tại nhiều bản sao của một gen lạ gần nhau (sự sắp xếp nhiều phân tử vector kế tiếp nhau trong hệ gen của một cây biến nạp gen hoặc nhiều bản sao của gen biến nạp) tạo nên quá trình này.

Người ta cho rằng sự bất hoạt của gen biến nạp lặp lại như là một cơ chế bảo vệ chống lại những nhân tố gen di động như transposone (gen nhảy). Transposone có số lượng bản sao lớn và có thể gây ra những đột biến trong hệ gen. Đặc biệt khi nghiên cứu di truyền phân tử ở nấm, phần lớn những transposone có trong nấm *Ascobolus immersus* ở dạng methyl hóa và do vậy mà bất hoạt.

Những gen biến nạp lặp lại dạng chòm thường gặp khi biến nạp tế bào trần và biến nạp phi sinh học, ngược lại rất hiếm khi xảy ra ở biến nạp bằng *Agrobacterium tumefaciens*. Điều này tạo các cơ chế khác nhau của sự biến nạp DNA vào hệ gen thực vật.

Sự methyl hóa DNA lặp lại xảy ra ở nguyên tử thứ 5 của vòng cytosine và thường ở trình tự base CG hoặc CNG, ở đây C và G là cytosine và guanine, N là ký hiệu cho một trong bốn base. Những trình tự được methyl hóa hoặc là không được phiên mã hoặc hiếm khi được phiên mã, do đó sự biểu hiện của gen bị giảm hoặc hoàn toàn bị ức chế.

Nhiều bản sao của gen nằm thành chòm ở một vị trí được gọi là sự bất hoạt *cis*. Bên cạnh đó có sự bất hoạt *trans*, ở đây một phân tử DNA bất hoạt nằm xa một phân tử khác, ảnh hưởng âm tính đến sự biểu hiện gen.

1.5.6. Đồng ức chế

Sự bất hoạt gen được biến nạp không phải luôn luôn là do sự methyl hóa DNA. Sự bất hoạt còn do sự đồng ức chế xảy ra sau khi phiên mã, ví dụ

quá trình sắp xếp lại sau phiên mã. Biểu hiện của sự đồng ức chế là sự giảm lượng RNA của gen phiên mã từ 20-50 lần. Nhiều thí nghiệm đã chỉ ra, ở đây không phải là do hoạt động phiên mã bị giảm xuống mà là sự tăng cường phân giải RNA.

Giải thích điều này người ta cho rằng do một RNA-polymerase phụ thuộc RNA sao chép ít RNA, số lượng này nằm trên một giá trị giới hạn. Các bản sao RNA này sau đó kết hợp với sản phẩm phiên mã như RNA antisense, tạo nên một RNA mạch kép, bị phân giải nhanh bởi enzyme tương ứng.

Cơ chế đồng ức chế đã cản trở việc tạo nên cây biến đổi gen, nhưng nó cũng có ý nghĩa trong việc tạo nên những cây biến đổi gen kháng virus.

Tóm lại. Để biến nạp gen vào thực vật bậc cao có ba phương pháp được sử dụng là biến nạp bằng *Agrobacterium*, bắn gen và tế bào trần. Chọn lọc và tái sinh là những yếu tố quyết định để thu được những cây biến nạp hoàn chỉnh. Xác nhận sự biến đổi gen của thể hệ tái sinh từ vật liệu biến đổi gen được thực hiện bằng kỹ thuật Southern, PCR hoặc sử dụng các gen chỉ thị. Do sự cấu tạo phức tạp của tế bào và mô thực vật nên phải có những trình tự promoter để tăng cường sự biểu hiện của một gen lạ ở đúng vị trí mong muốn. Với cơ chế RNA antisense sự biểu hiện của gen có thể bị giảm hoặc bị ức chế hoàn toàn. Trong thực vật biến đổi gen, DNA lạ không phải luôn luôn biểu hiện vì chúng bị bất hoạt do sự methyl hóa và cơ chế đồng ức chế.

Câu hỏi

1. Các phương pháp chuyển gen được dùng phổ biến hiện nay? Ưu và nhược điểm của các phương pháp đó?
2. Hệ thống gen chọn lọc và chỉ thị được sử dụng để chuyển gen vào thực vật?
3. Các phương pháp xác nhận sự có mặt của sản phẩm gen?
4. Promoter là gì? Chức năng của promoter trong sự biểu hiện của gen ngoại lai, cho ví dụ?
5. Những cơ chế làm bất hoạt các gen ngoại lai trong thực vật chuyển gen?

Chương 2

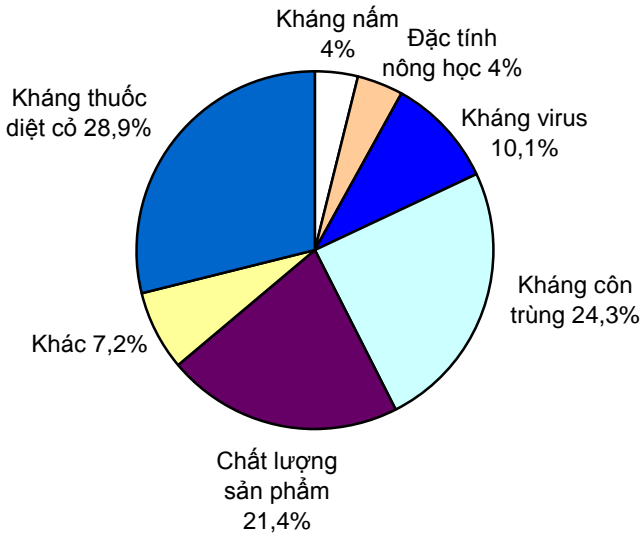
Những đặc tính mới của cây chuyển gen

Trong hơn thập kỷ qua, nhờ thành tựu to lớn của công nghệ gen, người ta đã chuyển thành công những gen phân lập từ sinh vật này vào những sinh vật khác để tạo ra cơ thể biến đổi gen mang các đặc tính mong muốn. Sản phẩm biến đổi gen đang đem lại những lợi nhuận kinh tế khổng lồ cho nhiều quốc gia. Ở Mỹ, hiện nay có tới 1.300 công ty Công nghệ sinh học với doanh thu hàng năm đạt khoảng 12,7 tỷ đô la. Trong số các sản phẩm tạo ra (có liên quan đến biến đổi gen), sản phẩm y dược chiếm tới 75%, trong khi sản phẩm nông nghiệp chỉ chiếm 3%. Tuy nhiên, sự đầu tư mở rộng quy mô nghiên cứu và khai thác sản phẩm nông nghiệp biến đổi gen ngày càng tăng.

Năm 1996, toàn thế giới chỉ có 1,7 triệu ha trồng cây biến đổi gen, nhưng đến năm 2004 diện tích cây trồng biến đổi gen toàn cầu tăng lên gần 48 lần, đạt tới 81 triệu ha, trong đó hơn 1/3 diện tích này là ở các nước đang phát triển. Hiện nay, có khoảng 20 quốc gia sản xuất cây trồng biến đổi gen với diện tích từ 50.000 ha trở lên. Mỹ là quốc gia hàng đầu trồng cây biến đổi gen với diện tích trong năm 2004 là 47,6 triệu ha (chiếm 59%). Tiếp đến là Argentina: 16,2 triệu ha (20%), Canada: 5,4 triệu ha (6,7), Brazil: 5 triệu ha (6%), Trung Quốc: 3,7 triệu ha (4,6%). Ở châu Á, cây trồng biến đổi gen chủ yếu là bông, được trồng nhiều ở Trung Quốc, Ấn Độ, Philippines và Indonesia.

Có 4 loại cây trồng biến đổi gen được thương mại hóa mạnh nhất. Đó là: đậu tương kháng thuốc diệt cỏ đạt đến diện tích 48,4 triệu ha (chiếm 60% tổng diện tích cây trồng biến đổi gen năm 2004), ngô kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu đạt diện tích 19,3 triệu ha (chiếm 24%), bông kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu đạt diện tích 9 triệu ha (chiếm 11%) và cải dầu kháng thuốc diệt cỏ đạt diện tích 4,3 triệu ha (chiếm 5%). Nếu so sánh diện tích trồng cây biến đổi gen với tổng diện tích cây trồng cùng loại ở quy mô toàn cầu thì đậu tương biến đổi gen chiếm 56%, bông biến đổi gen chiếm 28%, cải dầu biến đổi gen chiếm 19% và ngô biến đổi gen chiếm 14%. Ngoài 4 loại cây trồng biến đổi gen chính đã được thương mại hóa rộng rãi nói trên, còn

có hàng loạt các cây trồng biến đổi gen khác như kháng nấm, kháng virus, chín chậm... cũng đã và đang được phổ biến.



Hình 2.1. Tỷ lệ (%) của các loại cây biến đổi gen được đưa vào sản xuất.

Thực vật biến đổi gen đã mang lại những đặc tính tốt cho cây trồng. Chương này đề cập đến những biến đổi gen ở thực vật. Cho đến nay gen được chuyển vào thực vật nhiều nhất là gen kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng. Vì vậy, đã làm giảm một lượng đáng kể thuốc diệt cỏ và trừ sâu được sử dụng trong nông nghiệp.

Bên cạnh đó, các nhà khoa học cũng đã tạo ra những cây biến đổi gen kháng vi khuẩn, virus và nấm. Khả năng chống chịu những điều kiện ngoại cảnh bất lợi như khô hạn, nóng hoặc kim loại nặng của cây trồng cũng được cải thiện.

Ngoài ra, nhờ kỹ thuật gen đã tạo ra những thực vật có giá trị dinh dưỡng hơn, hàm lượng vitamin và khoáng cao hơn. Mùi vị và khả năng lưu giữ của quả cũng được nâng lên.

Thực vật biến đổi gen cũng sẽ cung cấp nguyên liệu như carbohydrate, chất béo và chất dẻo phân giải sinh học.

Trong lĩnh vực y học, thực vật chuyển gen cung cấp các alkaloid và những chất miễn dịch có ý nghĩa. Sự nhiễm bản của vaccine với virus gây bệnh ở người về cơ bản được loại trừ.

Những hiểu biết về sự xuất hiện dạng và màu hoa cũng cho phép tạo nên những loài hoa mới.

Những cây bất dục được nhân tạo được tạo ra cho mục đích sản xuất giống.

Sau đây sẽ đề cập cụ thể hơn về các kết quả này.

2.1. Tăng tính kháng và thích nghi với môi trường

Sự mất mùa lớn hàng năm luôn xảy ra do côn trùng, bệnh và cỏ dại cũng như do ảnh hưởng bất lợi của điều kiện ngoại cảnh và những yếu tố phi sinh học khác.

Theo một kết quả nghiên cứu, mất mùa do bệnh gây ra từ năm 1988 đến 1990 là 12,4% ở lúa mỳ, 15% ở lúa và 16,3% ở khoai tây, đã ảnh hưởng lớn đối với sản xuất nông nghiệp.

Chế độ canh tác độc canh cần một lượng lớn thuốc bảo vệ thực vật, đã làm ảnh hưởng đến môi trường sống. Gần đây, cây trồng chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng được sử dụng, có ý nghĩa lớn trong việc bảo vệ môi trường.

2.1.1. Kháng thuốc diệt cỏ

Trong sản xuất nông nghiệp có tính chuyên môn hóa cao thì việc sử dụng các loại thuốc diệt cỏ dại là điều rất cần thiết nhằm đảm bảo năng suất cây trồng. Tuy nhiên, việc lạm dụng một số thuốc diệt cỏ có độc tính cao đã và đang gây ra các hậu quả nghiêm trọng đối với môi trường, hệ sinh thái và sức khỏe con người. Gần đây, người ta đã tổng hợp được một số hợp chất chỉ tồn tại trong tự nhiên một thời gian ngắn, nhưng lại tiêu diệt toàn bộ cây cối. Các hợp chất này được gọi là thuốc diệt cỏ không chọn lọc.

Bằng phương pháp sử dụng đột biến, người ta đã phân lập được một số gen tạo cho cây trồng có khả năng kháng các loại thuốc diệt cỏ nói trên. Việc chuyển các gen này vào cây đã nâng cao tính chọn lọc và hiệu quả kinh tế của thuốc diệt cỏ cũng như làm giảm ảnh hưởng của thuốc đối với quần thể sinh vật trong đất. Thật vậy, khi chưa có loại cây trồng biến đổi

gen kháng thuốc không chọn lọc, người ta phải phun nhiều lần trước khi gieo hạt nhằm loại bỏ hoàn toàn mầm mống cỏ dại. Nhưng khi người nông dân gieo trồng loại cây biến đổi gen thì họ đợi cho cây trồng và cỏ dại cùng phát triển đến một mức độ nhất định, sẽ tiến hành phun thuốc một lần là có thể đảm bảo loại bỏ sự xâm lấn của cỏ dại. Đồng thời việc phun thuốc khi mà cây trồng đã phát triển sẽ làm giảm thuốc diệt cỏ thấm vào đất, làm giảm nguy cơ gây hại đối với môi trường.

Kháng thuốc diệt cỏ nhân tạo là đặc điểm thường được sử dụng nhiều nhất cho đến nay ở thực vật biến đổi gen.

Điều này có nhiều nguyên nhân:

- Thứ nhất là tạo ra thực vật biến đổi gen loại này tương đối đơn giản.
- Thứ hai, cỏ dại là một vấn đề lớn nhất trong nông nghiệp, làm giảm năng suất từ 10-15%.

Về cơ bản phân biệt loại thuốc diệt cỏ chọn lọc với loại không chọn lọc. Ở liều lượng nhất định loại kháng chọn lọc có tác dụng đối với thực vật có đặc điểm sinh lý và hình thái nhất định. Ví dụ: thuốc nhóm này gồm có: atrazin, bromoxynil, 2,4-D. Tác dụng của thuốc diệt cỏ chọn lọc:

Atrazin: Làm ngừng sự vận chuyển điện tử trong hệ thống quang hóa II ở lục lạp (cần thiết đối với quang hợp của thực vật). Ngô không mẫn cảm với atrazin.

Bromoxynil: Đình chỉ sự vận chuyển điện tử trong hệ thống quang hóa II của lục lạp, làm chết cây hai lá mầm.

Glyphosate (Round up^R): Làm ngừng hoạt động enzyme EPSP-synthase và qua đó kìm hãm sự tổng hợp các amino acid thơm.

Phosphinothricin (PPT) còn gọi là **Basta:** PPT là đồng phân dạng L của sản phẩm tổng hợp glufosinate. PPT có cấu trúc tương tự glutamic acid, gắn không thuận nghịch với enzyme glutamatsynthase, gây độc do tích lũy NH₃.

2,4-D: Auxin tổng hợp này gây hại cho sự phát triển của cây hai lá mầm, phần lớn cây một lá mầm không mẫn cảm.

Một số loại thuốc diệt cỏ chọn lọc tồn tại lâu trong đất, vì vậy nó làm nhiễm nguồn nước.

Ngược lại, thuốc diệt cỏ không chọn lọc như glyphosate hoặc phosphinothricin (PPT) độc đối với tất cả cây trồng.

Ưu điểm của hai loại thuốc diệt cỏ này là phân giải rất nhanh trong đất thành những chất không hại.

Thời gian bán hủy của Basta trong đất chỉ 10 ngày và Round up từ 3 đến 60 ngày. Thời gian bán hủy là khoảng thời gian mà 50% chất này bị biến đổi và phân giải.

Để sản xuất cây chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ, người ta cần những gen kháng mã hóa cho protein, những protein này hoặc làm bất hoạt thuốc diệt cỏ, hoặc thay đổi vị trí tác động của thuốc trong tế bào, làm thuốc không còn gây hại. Cơ chế kháng thuốc diệt cỏ không chọn lọc Basta và glyphosate được giải thích như sau:

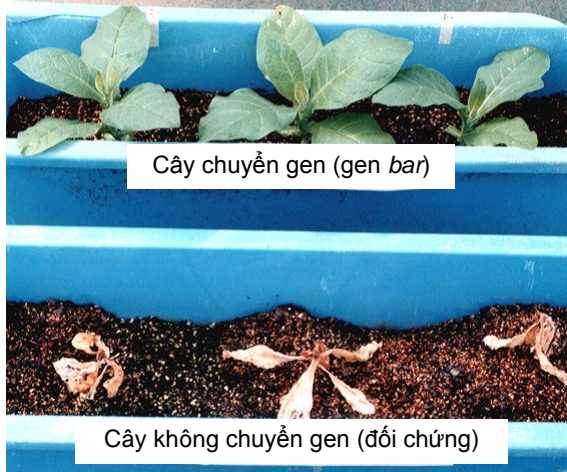
Basta là thuốc diệt cỏ không chọn lọc được sử dụng trong hơn 50 quốc gia, nhưng được sử dụng rất có giới hạn, vì nó gây độc ở cây trồng và cỏ dại như nhau. Gần đây, rất nhiều loại cây trồng biến đổi gen được tạo nên và đã được thử nghiệm trong hơn 100 thí nghiệm đồng ruộng, trong đó nhiều loại đã được đưa ra thị trường. Những gen kháng được phân lập từ vi sinh vật hoặc từ thực vật kháng trong tự nhiên. Từ cây linh lăng thảo (*Medicago sativa*) một gen không mẫn cảm với Basta được phân lập và từ vi khuẩn đất *Streptomyces hygroscopicus* và *S. viridochromogenes* 2 gen *bar* và *pat* được phân lập, những gen này mã hóa cho enzyme phosphinothricin-acetyltransferase. Enzyme này làm mất độc tính của thuốc bằng acetyl hóa, gắn vào một gốc acetyl. Để sử dụng cho thực vật, những gen từ vi khuẩn được biến đổi và được điều khiển bởi promoter CaMV 35S nhằm đạt được sự biểu hiện gen thường xuyên trong tất cả các mô. Bằng cách này cây linh lăng thảo, cà chua, ngô, lúa, lúa mì và đậu tương kháng thuốc diệt cỏ được tạo nên.

Thuốc diệt cỏ glyphosate đình chỉ đặc hiệu enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate-synthase (EPSP-synthase). Đây là enzyme cần thiết trong thực vật để tổng hợp amino acid thơm (phenylalanin, tryptophan và tyrosin), một số vitamin và các hợp chất có nguồn gốc thứ cấp. Enzyme này không có ở người và động vật, vì vậy glyphosate không độc đối với người. Glyphosate được phân giải trong đất nhờ vi sinh vật và không để lại sản phẩm độc hại nào.

Kháng glyphosate có thể do những cơ chế khác nhau:

- Thứ nhất trong cây có sự biểu hiện mạnh mẽ của enzyme của EPSP-synthase dưới sự điều khiển của promoter CaMV-35S và đồng thời tạo nên

một enzyme oxidoreductase của vi khuẩn. Nhờ enzyme oxidoreductase mà thuốc bị bất hoạt và với một lượng lớn EPSP-synthase được tạo nên thì lượng thuốc còn lại không thể gây hại ở cây biến đổi gen (Hình 2.2). Ở đây 2 gen cần thiết, trong đó gen oxidoreductase là không có trong thực vật.



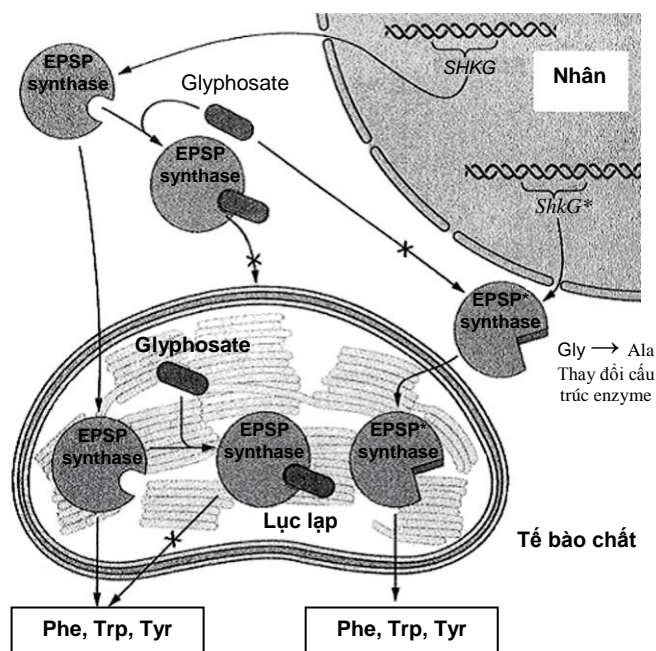
Hình 2.2. Hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ. Hình trên là cây chứa gen *bar* kháng basta. Hình dưới là cây đối chứng không chứa gen kháng này. Cả hai đều được phun basta. Ảnh chụp sau 15 ngày phun thuốc.

Một khả năng thứ hai là sử dụng EPSP-synthase của vi khuẩn. Từ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (loài CP4), EPSP-synthase vi khuẩn được phân lập và do sự thay đổi trình tự amino acid nên enzyme này không còn mẫn cảm với glyphosate và vì vậy được sử dụng trong nhiều cây trồng thương mại.

Thứ ba là xuất hiện một dạng đột biến EPSP-synthase của cây trồng có khả năng kháng glyphosate (Hình 2.3).

Tính kháng không chọn lọc được sử dụng đối với nhiều cây trồng biến đổi gen, như cây bông, khoai tây, ngô, đậu tương, thuốc lá và lúa mì.

Bằng việc sử dụng cây trồng kháng thuốc diệt cỏ, lượng thuốc diệt cỏ được sử dụng giảm đi đáng kể, vì thuốc được dùng theo yêu cầu và trong phạm vi nhỏ hơn.



Hình 2.3. Đột biến xảy ra trong EPSP-synthase làm cho cây kháng thuốc diệt cỏ glyphosate. Sự kết hợp của glyphosate vào enzyme EPSP-synthase ở loại hình bình thường đã làm mất hoạt tính xúc tác và hạn chế sự di chuyển của enzyme này vào lục lạp. Dạng EPSP*-synthase (mã hóa bởi *ShkG**-dạng đột biến) có hoạt tính thấp với glyphosate và vẫn thể hiện hoạt tính khi có mặt của thuốc diệt cỏ này.

Năm 1996 và 1997 ở Mỹ, khi sử dụng cây kháng thuốc diệt cỏ đã làm giảm lượng thuốc dùng tương ứng là 26% và 22%. Rửa trôi đất giảm 90%, do đất không phải cày sâu, đồng thời năng suất tăng lên 5%.

Một vấn đề khó khăn trong việc sử dụng cây biến đổi gen là sự lan truyền tính kháng qua hạt phấn đến những cây họ hàng. Để giải quyết vấn đề này việc tạo cây biến đổi gen là dựa vào sự thay đổi các gen trong lục lạp thể. Vì gen lục lạp thể ở phần lớn thực vật di truyền theo tế bào chất, vì vậy tính kháng thuốc diệt cỏ không thể lan truyền được qua hạt phấn.

EPSP-synthase hoạt động ở trong lục lạp thể. Nhưng gen mã hóa cho enzyme này lại có mặt ở trong nhân. Protein được dịch mã ở ribosome trong

tế bào chất và do có trình tự đích của lạp thể nên được vận chuyển vào cơ quan tử này. Cây thuốc lá kháng glyphosate đã được tạo nên bằng cách biến nạp gen mã hóa cho EPSP-synthase có nguồn gốc từ cây dã yên thảo. Gen này được chèn vào DNA của lạp thể. Lạp thể cũng có ribosome nên tổng hợp trực tiếp EPSP-synthase. Bằng cách này việc vận chuyển gen qua hạt phấn ở phần lớn cây trồng đã không xảy ra.

2.1.2. Kháng côn trùng gây hại

Các tổn thất trước thu hoạch gây ra bởi các loại sâu phá hoại là một trong các nguyên nhân chủ yếu làm giảm năng suất cây trồng, đặc biệt là ở các nước nhiệt đới có nhiệt độ cao, ẩm độ lớn, thích hợp cho sự phát triển sâu bệnh như ở nước ta.

Côn trùng gây hại cây trồng ở hai khía cạnh:

- Thứ nhất là gián tiếp truyền các tác nhân gây bệnh khác như virus, vi khuẩn hoặc nấm.

- Thứ hai là trực tiếp ăn hại các cơ quan của cây trồng.

Biện pháp hữu hiệu được sử dụng rộng rãi hiện nay là phun thuốc trừ sâu hóa học. Việc sử dụng thuốc trừ sâu làm ảnh hưởng đến môi trường sinh thái, do dư lượng còn lại tích lũy trong chuỗi thức ăn và mặt khác thuốc trừ sâu gây độc không đặc hiệu đối với tất cả động vật. Vì vậy, sự phát triển những cây trồng chuyển gen kháng sâu có ý nghĩa lớn.

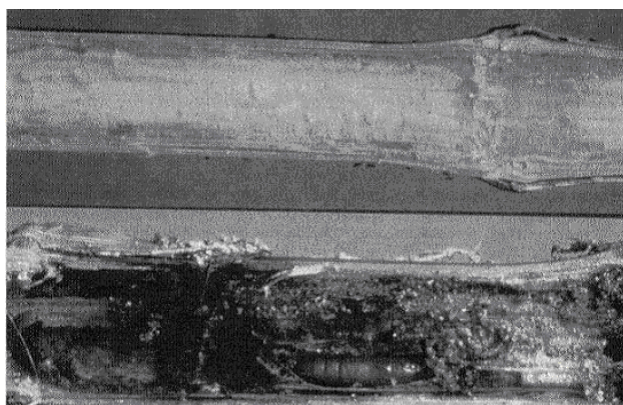
Ở đây đề cập đến một loại toxin tự nhiên, được tạo ra trong vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và chỉ gây hại ở một số loài côn trùng nhất định, không hại đối với các động vật khác và con người. Toxin này được gọi là Bt-toxin.

B. thuringiensis là một vi khuẩn đất tạo bào tử. Ở quá trình tạo bào tử xuất hiện những vỏ tinh thể chứa δ -endotoxin. Ở các loài *B. thuringiensis* khác nhau người ta đã xác định được hơn 100 loại toxin khác nhau, là những protein với khối lượng phân tử khoảng 130 kDa. Trong ruột côn trùng δ -endotoxin được biến đổi thành dạng độc tố hoạt động và tích lũy trong tế bào thượng bì ruột. Việc tạo bào tử trong màng dẫn đến sự phân giải thẩm thấu những tế bào này và làm cho côn trùng chết.

Trong nông nghiệp sinh thái vi khuẩn *B. thuringiensis* được phun trực tiếp trên đồng ruộng. Tuy nhiên, đối với một số cây trồng, việc phun thuốc

trừ sâu Bt đôi khi ít hiệu quả do đặc tính hình thái của cây trồng tại thời điểm cần phun thuốc. Ví dụ: đối với cây ngô loại côn trùng phá hoại chính là sâu đục thân *Ostrinia nubilalis*. Để phòng trừ loại sâu này, người ta phun thuốc vào thời điểm sâu bắt đầu nở. Nhưng do đặc tính khí hậu ở một số vùng, thời điểm sâu bắt đầu nở rơi đúng vào lúc cây đã phát triển. Điều này ngăn cản thuốc trừ sâu Bt đi tới các mô, các bộ phận mà sâu đục thân phá hoại. Mặt khác, thuốc trừ sâu Bt rất dễ phân hủy trong môi trường tự nhiên, đặc biệt dưới ánh sáng mặt trời chứa nhiều tia cực tím. Do vậy, ở những vùng thích hợp cho sự phát triển của sâu đục thân, khiến cho thời kỳ sinh sản của sâu kéo dài, người nông dân phải phun thuốc nhiều lần rất tốn kém.

Bắt nguồn từ các hạn chế của việc phun thuốc trừ sâu Bt, các nhà khoa học đã chuyển gen *Bt* vào nhiều loại cây trồng. Lúc này, cây chuyển gen *Bt* có khả năng sinh tổng hợp trực tiếp loại thuốc trừ sâu sinh học. Điều này giúp cho việc phòng trừ trở nên hiệu quả hơn và giảm chi phí mua thuốc trừ sâu cho người nông dân.



Hình 2.4. Cây ngô biến đổi gen, tạo ra Bt-endotoxin (phía trên) và cây ngô bình thường bị nhiễm sâu hại (phía dưới).

Gen mã hóa cho Bt-toxin được biến đổi cho phù hợp với thực vật, được đưa vào các cây trồng khác nhau như bông, ngô, khoai tây và cà chua chuyển gen đang được sản xuất thương mại biểu hiện độc tố của Bt để tạo ra tính kháng đối với các côn trùng loại nhai-nghiền (chewing insects). Vì

khuẩn *B. thuringensis* tổng hợp các protein δ -endotoxin tinh thể được mã hóa bởi các gen *Cry*.

Người ta phân biệt 4 nhóm endotoxin (*Cry*I đến *Cry*IV), tùy thuộc nó độc với loài sâu nào, đối với *Lepidoptere* (bướm, *Cry*I), *Lepidoptere* và *Diptere* (ruồi và muỗi, *Cry*II), *Coledoptere* (côn trùng cánh cứng, *Cry* III) và *Diptere* (*Cry* IV).

Sau nhiều thí nghiệm đồng ruộng các loại cây trồng chứa gen *Bt* đã có mặt trên thị trường với kết quả tốt. Ví dụ: với việc sử dụng ngô chứa gen *Bt* năm 1996 và 1997 đã làm giảm lượng thuốc trừ sâu cho cây ngô ở Mỹ 10%, năng suất tăng lên 9%, bông chứa gen *Bt* năng suất tăng 7%. 60% nông dân loại bỏ hoàn toàn thuốc trừ sâu.

Một số ưu điểm của độc tố *Bt* như sau :

- Tính đặc hiệu, mỗi protein *Cry* chỉ hoạt động chống lại một hoặc một vài loài côn trùng.
- Sự đa dạng, nhiều protein *Cry* khác nhau đã được nhận biết.
- Các ảnh hưởng không bất lợi hoặc bị giảm đã được xác nhận trên các côn trùng không phải đích hoặc các địch thủ tự nhiên của côn trùng.
- Độc tính với động vật có vú là rất thấp.
- Có thể thoái biến dễ dàng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy điểm mấu chốt là gen chịu trách nhiệm tổng hợp protein tinh thể trừ sâu của vi khuẩn *B. thuringensis* chủng *kurstaki*, chưa đặc biệt biểu hiện rõ ở cây trồng. Để nâng cao hiệu quả của độc tố, các nhà nghiên cứu đã cắt gọt bớt gen chỉ để tổng hợp phần protein có hoạt tính chứa độc tố mà không cần các phần gen phụ khác. Gen *Cry* được cắt bớt đã biểu hiện tổng hợp protein gấp 500 lần so với gen nguyên thủy. Hiện nay, hơn 40 gen khác nhau mang tính kháng côn trùng đã được hợp nhất trong cây trồng chuyển gen với một vài giống đã được thương mại hóa ở các nước như Mỹ, Úc...

Lợi ích của các độc tố *Bt* trong kiểm soát côn trùng đã buộc chúng ta phải có các phương thức quản lý khác nhau để làm chậm sự phát triển của tính kháng của côn trùng đối với *Bt*, bao gồm :

- Bố trí các vùng bên cạnh trồng cây bông không chuyển gen *Bt*, làm nơi trú ẩn để giảm áp lực chọn lọc hướng tới việc kháng côn trùng.

- Triển khai các gen kháng côn trùng khác nhau (Ví dụ: protease inhibitors).

- Dùng các loại độc tố Bt cho các receptor đích khác nhau.

- Dùng các promoter khác nhau để điều chỉnh sự biểu hiện của các gen Bt.

- Dùng các promoter đặc trưng mô (tissue-specific promoter), như thế côn trùng có thể ăn mà không tổn hại đến kinh tế trên các bộ phận ít quan trọng của thực vật.

- Có các hướng khác để phát triển tính kháng côn trùng cho cây chuyển gen dựa trên cơ sở: protease inhibitors, α -amylase, lectins, chitinases, cholesterol oxidase, các virus của côn trùng được tạo dòng, tryptophan decarboxylase, anti-chymotrypsin, bovine pancreatic trypsin inhibitor và nhân tố ức chế lá lách.

Dĩ nhiên là Bt-toxin không độc cho tất cả mọi côn trùng và trong tự nhiên luôn có khả năng xuất hiện những loài sâu kháng. Vì vậy, phải có chiến lược tiếp tục tạo ra những loại cây trồng kháng.

Đặc biệt hứa hẹn là chất ức chế serin-protease, kìm hãm các enzyme tiêu hóa quan trọng của côn trùng. Những cây trồng chứa một lượng lớn protein này có tác dụng bảo vệ trước sự phá hoại của sâu hại.

Ngoài ra, nhiều phương pháp khác cũng được thử nghiệm. Về nguyên tắc các phương pháp này dựa trên việc sử dụng những protein có trong tự nhiên đặc hiệu chỉ gây hại cho côn trùng. Điều này đặc biệt có ý nghĩa ở trong cây lương thực và thực phẩm vì nó không chứa những chất độc gây hại cho người tiêu dùng.

2.1.3. Kháng virus gây bệnh

Tương tự như vi khuẩn, động vật và người; ở thực vật cũng tồn tại một số lượng lớn virus. Ngoài ra, ở thực vật còn có thể được gọi là viroide.

Virus chứa một vỏ protein và trong đó có cả màng lipid. Vật chất di truyền của virus là DNA hoặc RNA. Viroide không có vỏ protein và màng mà chỉ có phân tử RNA ở dạng vòng nhỏ. Sự tái sinh virus và viroide hoàn toàn phụ thuộc vào trao đổi chất của ký chủ. Theo quy ước quốc tế tên của virus được gọi theo tên thực vật đầu tiên mà loại virus đó được tìm ra, sau đó đến triệu chứng đầu tiên và thêm từ virus (ví dụ: thuốc lá-khảm-virus:

tobacco-mosaic-virus). Virus thực vật cần sinh vật khác để truyền từ cây này sang cây khác. Ở đây phần lớn là nhờ côn trùng, và khi chúng mang virus được gọi là vector.

Virus thường được coi là tác nhân gây bệnh nguy hiểm. Tuy nhiên, quan niệm này không hoàn toàn chính xác, vì khi phân tích từng phần hệ gen thực vật cho thấy, trong cây trồng và cây hoang dại tồn tại số lượng lớn các loại virus, trong chúng phần lớn là không gây hại. Ngoài ra, virus ở thực vật không phải là virus ở người và động vật. Chỉ có một số loài virus gây thiệt hại lớn cho mùa màng. Ví dụ loài virus tạo ra nhiều rễ nhỏ ở củ cải đường trong một số vùng lớn ở Đức đã gây thiệt hại đến 75%.

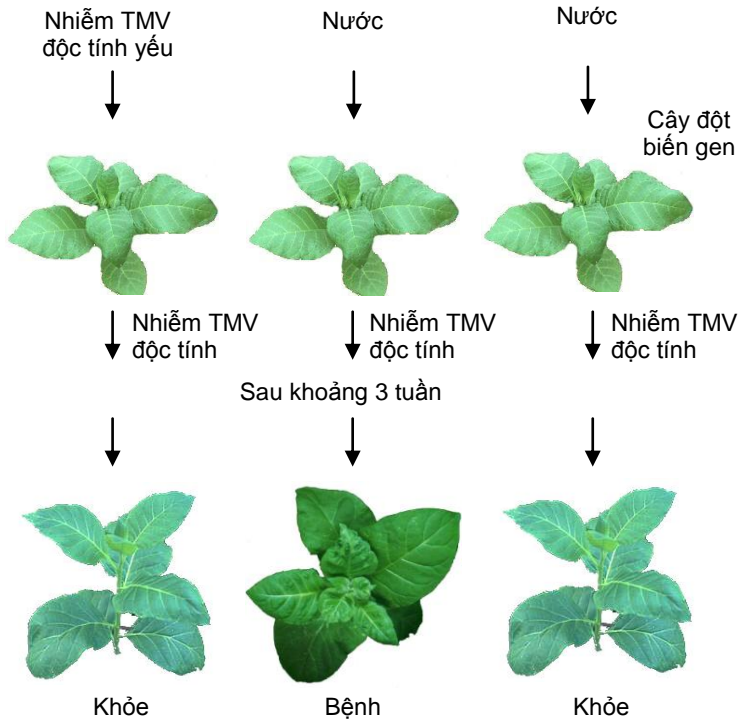
Triệu chứng ở thực vật sau khi virus xâm nhiễm (thay đổi màu, dạng và chết) rất đa dạng và phụ thuộc vào các yếu tố môi trường. Ngược lại, virus thực vật có cấu tạo đơn giản, vì chúng gồm một vỏ protein đơn giản và bên trong vỏ này chứa nucleic acid mang những gen khác nhau.

Phần lớn virus chứa những gen mã hóa cho vỏ protein, cho sao chép thông tin di truyền của nó (từ DNA hoặc RNA) và một gen cho sự di chuyển bên trong thực vật từ tế bào này đến tế bào khác.

Thường tồn tại những chủng virus họ hàng với mức độ gây bệnh khác nhau. Có những chủng không gây triệu chứng, có độc tính thấp, trong khi đó có những chủng gây triệu chứng hại rất nặng, được gọi là virus có độc tính cao. Đã lâu người ta biết rằng, nếu tiêm chủng trước đó với loài virus độc tính yếu thì ở trong cây xuất hiện tính miễn dịch đối với loài virus họ hàng độc tính mạnh hơn. Sự tái sinh của virus bị ngừng hoặc là giảm rất mạnh, được gọi là bảo vệ chéo (cross protection) (Hình 2.5).

Người ta lợi dụng hiệu quả trên để tạo cây biến đổi gen kháng virus. Đầu tiên những gen mã hóa cho protein vỏ của virus được đưa vào thực vật và biểu hiện dưới sự điều khiển của promoter CaMV 35S. Thực tế cho thấy những cây này sau khi nhiễm virus không xuất hiện triệu chứng. Theo cơ chế này những tính kháng cơ bản với nhiều loại virus khác nhau được tạo nên.

Nhiều phương thức được sử dụng để kiểm soát sự xâm nhiễm virus bao gồm các xử lý hóa học để giết các vector virus, chuyển vào cây trồng các gen kháng tự nhiên từ các loài liên quan, sử dụng các phương pháp chẩn đoán hiện đại như PCR và đưa ra những chỉ dẫn thích hợp để đảm bảo nhân giống các vật liệu khởi đầu sạch virus (ví dụ: hạt, củ...).



Hình 2.5. Thí nghiệm về bảo vệ chéo. Bên trái: Cây thuốc lá được xử lý với TMV yếu, sau đó được lây nhiễm với TMV độc tính và kết quả là cây không gây bệnh. Ở giữa: Cây thuốc lá không được xử lý với TMV yếu, xuất hiện triệu chứng bệnh sau khi xử lý với TMV độc tính. Bên phải: Cây biến đổi gen, chứa các gen mã hóa cho protein vỏ của TMV, kháng được sự lây nhiễm

Tuy nhiên, phương pháp chủ yếu để khắc phục tình trạng trên là khai thác tính kháng xuất phát từ các tác nhân gây bệnh. Chẳng hạn, sử dụng các trình tự có nguồn gốc từ virus được biểu hiện trong các cây chuyển gen để tạo ra tính kháng đối với các virus thực vật. Hướng này dựa trên cơ sở các nghiên cứu về sự gây nhiễm (inoculation) hay xâm nhiễm (infection) ở thực vật, được khởi đầu với các chủng virus nhẹ tạo ra khả năng bảo vệ chống lại sự gây nhiễm tiếp theo với cùng chủng virus hoặc các virus có liên quan gần

gũ. Tính kháng bắt nguồn từ tác nhân gây bệnh như vậy cần sự biến nạp thực vật với các trình tự có nguồn gốc từ virus. Tính kháng vật chủ xuất hiện từ hai cơ chế khác nhau: (1) Sự bảo vệ được dàn xếp thông qua biểu hiện của các protein virus tự nhiên hoặc đã được biến đổi (ví dụ: protein vỏ, replicase, và replicase khiếm khuyết). (2) Sự bảo vệ được dàn xếp ở mức độ phiên mã (RNA-mediated resistance), đòi hỏi sự phiên mã của RNA hoặc từ các trình tự hoàn chỉnh hoặc từng phần có nguồn gốc từ virus đích (bao gồm các gen cho protein vỏ, replicase, replicase khiếm khuyết, protease, protein vận động...).

Một đường hướng khác tạo ra cây trồng kháng là dựa trên việc sử dụng những gen kháng (các gen R) tồn tại ở một số thực vật tự nhiên. Những gen kháng này đã xuất hiện trong quá trình tiến hóa của một số loài thực vật và mỗi một tính kháng chống lại một tác nhân đặc hiệu.

Người ta chuyển một gen R vào một cây trồng khác thì cây này sẽ kháng được tác nhân đặc hiệu đó. Bằng cách này không những kháng virus có hiệu quả mà người ta còn biết các gen R kháng vi khuẩn, nấm và tuyến trùng. Trong tương lai có thể tạo nên các gen R có tính đặc hiệu xác định.

Trong những năm 80, bệnh virus đốm vòng ở cây đu đủ đã xuất hiện ở vùng Hawaii. Năm 1994, gần một nửa diện tích đu đủ của quốc gia này bị bệnh. Một giống kháng bệnh rất cần nhưng phương pháp lai tạo truyền thống đã không thành công. Các nhà nghiên cứu ở Đại học Cornell và Đại học Hawaii quyết định tìm một dạng kháng bệnh này. Họ đã sử dụng công nghệ gen để chèn các gen mã hóa cho vỏ protein của virus đốm vòng đu đủ được phân lập từ virus này vào DNA của cây đu đủ. Sự có mặt của protein vỏ virus trong cây đã ngăn cản sự lây nhiễm virus vì các gen virus cần để gây nhiễm không có mặt. Như vậy, đã tạo ra một loại miễn dịch thực vật. Sau khi kiểm tra sự an toàn cần thiết người ta đã sử dụng loại cây đu đủ biến đổi gen để sản xuất.

2.1.4. Kháng vi khuẩn và nấm

Vi khuẩn là những sinh vật tiền nhân. Cũng như virus, phần lớn vi khuẩn là tác nhân gây bệnh nguy hiểm, mặc dù thực tế cũng chỉ một số lượng nhỏ. Gần đây, được biết có 200 loài gây bệnh ở thực vật trong tổng số khoảng hơn một triệu loài.

Đối với bệnh vi khuẩn, hướng nghiên cứu tạo giống mới bằng công nghệ gen chỉ mới bắt đầu. Về cơ bản có ba hướng: (1) Dùng gen mã hóa enzyme làm thoái hóa thành tế bào vi khuẩn, chẳng hạn gen sản xuất lysozyme từ các nguồn tế bào động vật hoặc từ bacteriophage T₄ đưa vào cây thuốc lá và khoai tây. Các gen này biểu hiện hoạt tính lysozyme mạnh và các tế bào có khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwina carotovora* rất tốt. (2) Gen mã hóa α -thionin-cystein được chuyển vào cây thuốc lá cũng phòng ngừa được vi khuẩn *Pseudomonas syringae*. (3) Chuyển nạp gen sản xuất protein làm giảm độc tố của vi khuẩn là hướng có nhiều hứa hẹn. Gen này chủ yếu sản xuất các loại enzyme phân hủy độc tố của vi khuẩn, do vậy đã ngăn cản tác hại của chúng.

Nấm thuộc vào sinh vật nhân chuẩn (eukaryote), có khoảng 8.000 trong 100.000 loài nấm đã biết gây hại nặng ở thực vật.

Một sự kiện nổi bật là sự phá hủy vụ khoai tây ở Ailen vào năm 1845 và những năm sau đó do nấm *Phytophthora infestans*. Sự kiện này đã dẫn đến nạn đói lớn nhất và sự di cư của hàng triệu người từ nước này đến Mỹ. Cho đến nay dân số nước này vẫn chưa đạt đến con số trước năm 1845.

Mất mùa do vi khuẩn và nấm vẫn luôn là vấn đề lớn, vì vậy bắt buộc sử dụng thuốc trừ nấm trong nông nghiệp.

Một vấn đề nữa là sự nhiễm thực phẩm do mycotoxin mà nấm thải ra, thường gặp khi thực phẩm thực vật không được xử lý bằng thuốc trừ nấm. Mycotoxin về cấu tạo hóa học rất đa dạng, có thể gây bệnh nặng ở người và động vật và có thể gây ung thư nếu sự tiếp nhận thực phẩm này trong thời gian dài. Khả năng gây hại chính xác của nó cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ.

Vì phương thức tạo ra cây biến đổi gen kháng vi khuẩn và nấm có phân tương tự nhau, nên được đề cập chung ở đây.

Việc sử dụng các gen kháng trong cây biến đổi gen đã được nêu rõ ở phần trên. Những gen kháng cụ thể có ý nghĩa và đã được thử nghiệm trong cây biến đổi gen.

Gen kháng mã hóa cho các chất nhận, chúng kích thích nhiều phản ứng bằng chuỗi vận chuyển tín hiệu, ví dụ tạo nên kháng thể. Những gen này là sự quan tâm lớn của các nhà sản xuất.

Sản xuất những chất chống lại vi sinh vật trong cây biến đổi gen đã được thử nghiệm từ nhiều năm nay, nhưng kết quả thu được chưa thống nhất. Ví dụ: người ta đã thử nghiệm chitinase trong cây biến đổi gen, vì thành tế bào của nhiều loài nấm chứa chitin. Thực tế đã cho kết quả tốt ở một số thực vật do nấm gây bệnh.

Cải tạo các giống cây trồng kháng nấm hại dựa trên nguyên lý đưa gen mã hóa một loại enzyme nào đó có tác dụng ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự phát triển của nấm hại. Các enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm chitin và β -1,3 glucan là loại đang được chú ý. Khi có gen chitinase chuyển vào, cây thuốc lá chuyển gen đã tăng hoạt tính kháng nấm gây hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gen chitinase và glucanase trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm gây hại cao hơn cây có một gen độc lập. Cũng tương tự, cà chua có tính kháng nấm *Fusarium* cao hơn hẳn, sau khi được chuyển cả hai gen nói trên. Protein ức chế ribosome (ribosomal inhibition protein-RIP) cũng biểu hiện tính kháng nấm khả quan. Cây thuốc lá cho tính kháng nấm rất tốt, khi cây được chuyển đồng thời gen RIP và chitinase.

Nhiều thực vật biến đổi gen khác nhau tạo ra protein kháng vi sinh vật khác nhau. Ở đây người ta thu được những kết quả trái ngược nhau, ví dụ α -thionin có nguồn gốc từ yến mạch được biến nạp vào cây thuốc lá kháng vi khuẩn *Pseudomonas syringae* và một thionin nhân tạo nội sinh biểu hiện mạnh kháng *Fusarium oxysporum*.

Nhiều tác nhân gây bệnh tạo ra trong cây các chất độc. Ngược lại cây trồng cũng tạo ra chất độc để tự bảo vệ chúng.

2.1.5. Kháng các điều kiện ngoại cảnh bất lợi

Thực vật gắn liền với vị trí của nó và vì vậy chúng đã phát triển cơ chế nhằm để chống lại những điều kiện bất lợi của môi trường. Ở đây phải kể đến nóng, lạnh, khô hạn, thiếu khoáng, nồng độ muối và kim loại cao, ô nhiễm môi trường và tia cực tím. Dĩ nhiên là không gặp tất cả những yếu tố này ở một vị trí và chúng có những ảnh hưởng khác nhau đến thực vật. Thực vật có khả năng chống chịu cao với những yếu tố bất lợi này có ý nghĩa đặc biệt cho những vùng khó khăn về nông nghiệp.

Điều này rất quan trọng, vì diện tích gieo trồng cho đến nay chưa đáp ứng đủ nhu cầu cho dân số thế giới ngày càng tăng. Vì vậy, bắt buộc phải

trồng cây trên những vùng rất khô hạn, nóng và lạnh, đặc biệt ở các nước đang phát triển với sự tăng dân số rất nhanh và nhiều vùng khó khăn về thời tiết.

Người ta cho rằng, phần lớn những yếu tố bất lợi gây hại trực tiếp hoặc gián tiếp làm xuất hiện những hợp chất oxy độc, hoạt động, được gọi ngắn gọn là ROS (*reactive oxygen species*).

ROS xuất hiện do sự vận chuyển điện tử từ chuỗi vận chuyển điện tử gắn liền với màng trong ty thể và lạp thể đến phân tử oxy. ROS hoạt động hóa học mạnh, gây hại cấu trúc tế bào và nucleic acid. Tất cả tế bào sống hiếu khí (cần oxygen) có khả năng phân giải nhanh những ROS. Ở người ROS gắn liền với quá trình lão hóa.

Người ta cho rằng, ROS được tạo nên đã hoạt hóa các gen, mã hóa cho các enzyme, xúc tác cho tổng hợp các chất chống oxy hóa (ví dụ, vitamin D hoặc E). Mặc dù các marker phân tử kháng khô hạn đã được sử dụng trong lai tạo truyền thống, nhưng những nghiên cứu về khả năng kháng điều kiện bất lợi ở thực vật biến đổi gen vẫn còn trong giai đoạn nghiên cứu. Ngoài ra, còn có lý do khác là mỗi một quá trình trong tế bào gắn chặt chẽ với nhau, chẳng hạn quá trình hô hấp gắn liền với quá trình quang hợp. Tuy nhiên, đã có một số triển vọng nhờ dựa trên sự biểu hiện của enzyme tổng hợp chất chống oxy hóa như các ví dụ sau:

- Người ta đã thành công trong việc tạo ra cây *Arabidopsis* biến đổi gen có mang enzyme cholinoygenase từ vi khuẩn *Arthrobacter globiformi*. Thực vật này tích lũy glycinbetaine và thể hiện tính chịu mặn cao. Ở những thí nghiệm khác glycinbetaine được phun lên cây ngô và cây kê (*Sorghum bicolor*) đã đạt được khả năng chống hạn tốt hơn và năng suất cao hơn. Ở nhiều cây trồng khác có sự tích lũy mannitol để chống lại khô hạn và nồng độ muối cao. Gen mã hóa cho mannitol-dehydrogenase có nguồn gốc từ *E. coli* được biến nạp vào thuốc lá và enzyme biểu hiện ở lạp thể nhờ một trình tự đích tương ứng. Một sự tích lũy mannitol làm tăng khả năng chống lại các chất oxy hóa.

- Người ta đã sử dụng gen mã hóa cho DNA helicase, loại enzyme có tác dụng tách DNA (giãn xoắn) trong suốt quá trình sao chép gen. Một helicase tìm thấy trong cây đậu Hà Lan cụ thể là chất PDH45 đã tăng khả năng chống chịu với nồng độ muối cao, sự khử nước và nhiệt độ thấp. Kết quả đã cho thấy sau khi chuyển gen PDH45 vào cây thuốc lá, thì cây này

không chỉ tiếp tục tăng trưởng trong điều kiện độ mặn cao, mà còn cho phép việc các thế hệ tiếp theo của cây này giữ được gen và tiếp tục chịu được độ mặn cao.

Các nhà nghiên cứu phát hiện thấy việc biểu hiện gen này trong cây thuốc lá tương tự như khả năng chịu mặn. Mặc dù cây thuốc lá chuyển gen được thử nghiệm trong điều kiện sinh trưởng khó khăn, nhưng chúng vẫn tiếp tục lớn lên, ra hoa và tạo quả với số lượng hạt kích thước hạt, khối lượng hạt và kích thước quả tương đương với những loại cây trồng hoang dại không phải chịu mặn.

Đất bị nhiễm kim loại cũng là một khó khăn trong nông nghiệp. Có những chiến lược khác nhau được phát triển để tạo ra cây kháng hoặc ít nhất là không mẫn cảm. Việc biểu hiện gen Hg-reductase, kháng thủy ngân có nguồn gốc từ vi khuẩn ở cây có họ hàng với mộc lan (*Liriodendron tulipifera*) đã chịu được nồng độ Hg cao so với cây bình thường.

Việc sử dụng các gen *metallothionin* cũng đã thành công ở cây thuốc lá biến đổi gen kháng cadmium.

Khi nghiên cứu cây *Crasterostigma plantagineum* có khả năng chịu hạn, người ta đã phát hiện được một số gen chỉ biểu hiện ở các mô chịu hạn. Phát hiện này mở ra những triển vọng trong tạo dòng, phân tích và chuyển gen vào thực vật tạo ra các cây có tính chịu hạn cao.

Đây là những ví dụ cho phép hy vọng rằng trong tương lai có khả năng tạo ra những cây biến đổi gen với khả năng chống hạn, muối và kim loại cao hơn.

2.2. Nâng cao chất lượng sản phẩm

Phần này thảo luận về vấn đề sản xuất lương thực với cây biến đổi gen. Ở đây phân biệt vấn đề trong các nước đang phát triển và các nước công nghiệp: Sự suy dinh dưỡng và thiếu lương thực vẫn tồn tại trong nhiều nước đang phát triển. Tuy nhiên, ở các nước công nghiệp do dị ứng hoặc không tiêu hóa đối với các thành phần trong thức ăn, đã làm ảnh hưởng phần nào đến chất lượng cuộc sống. Cuối cùng thì không nên xem nhẹ vấn đề vận chuyển thực phẩm từ nơi xa chuyển đến. Ví dụ: trái cây thường thu hoạch xanh, trong quá trình vận chuyển được gây chín nhân tạo. Từ những mối lo ngại này đã dẫn đến khả năng thay đổi thực vật theo hướng thay đổi các chất bên trong.

2.2.1. Carbohydrate và acid béo

Carbohydrate đóng vai trò quan trọng và có nhiều chức năng đối với thực vật và con người. Tất cả sự sống trên trái đất suy cho cùng đều dựa vào cây xanh, từ H_2O , CO_2 và năng lượng ánh sáng để tạo nên glucose và O_2 . Quá trình này xảy ra trong lục lạp và được gọi là quang hợp.

Quá trình tạo carbohydrate trong thực vật rất phức tạp, do vị trí tạo đường (phần lớn là ở lá cây) và vị trí tích lũy hoặc sử dụng đường (ví dụ: hoa, củ...) tách rời nhau và vì vậy phần lớn đường tạo ra ở dạng saccharose, được vận chuyển trong thực vật. Sự tích lũy carbohydrate chủ yếu ở dạng tinh bột, xảy ra ở trong vô sắc lạp (amyloplaste). Tinh bột là chuỗi các phân tử glucose, gồm mạch thẳng (amylose) và mạch phân nhánh (amylopectin). Tinh bột có vai trò lớn đối với sản xuất thực phẩm và là nguyên liệu cho công nghiệp. Khi sử dụng tinh bột cho các mục đích khác nhau, sự phân nhánh của amylopectin, độ lớn và cấu trúc của các hạt tinh bột có vai trò quan trọng. Nguyên lý của sinh tổng hợp đã rõ ràng và phần lớn những gen tham gia đã được tạo dòng.

Có thể thay đổi thành phần carbohydrate của thực vật bằng việc biểu hiện những gen mới hoặc bất hoạt những gen hiện có. Ví dụ: người ta đã thành công trong việc chuyển enzyme AGPase (ADP-glucose-phosphorylase) từ vi khuẩn đường ruột *E. coli* đã được biến đổi đã làm tăng khả năng tích lũy tinh bột trong khoai tây. Ngược lại bằng cơ chế antisense, enzyme tổng hợp tinh bột synthetase ở trong hạt tinh bột bị ức chế. Khoai tây được tạo ra bằng cách này chỉ chứa amylopectin mà không có amylose.

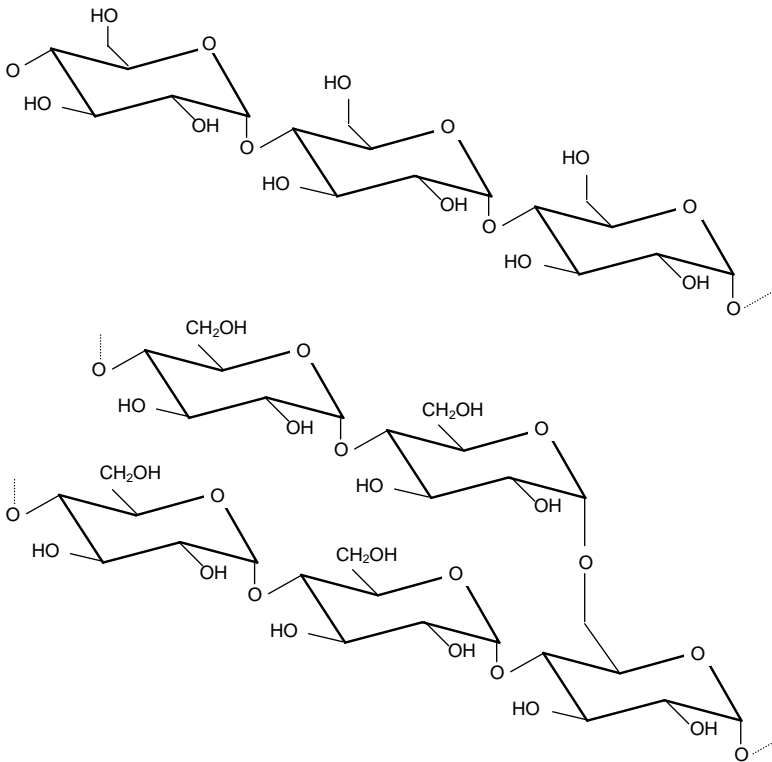
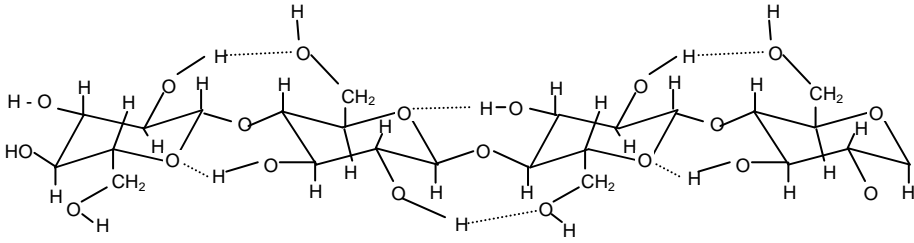
Không phải thị trường luôn luôn thú vị với cây biến đổi gen, vì những thay đổi về độ lớn củ hoặc làm giảm năng suất. Trong tương lai cần thiết phải tiếp tục phân tích các chức năng trao đổi chất liên quan phức tạp trong thực vật để tránh những hiệu quả phụ.

Cấu tạo hóa học tương tự với tinh bột là cellulose, một polysaccharide, chủ yếu tạo nên thành tế bào thực vật. Chuỗi cellulose không phân nhánh (Hình 2.6) và không có vai trò trong thức ăn của người, vì chúng không được tiêu hóa.

Chất béo là hợp chất ester của glycerine và các acid béo. Acid béo gồm một chuỗi carbon dài với đầu cuối là nhóm carboxyl. Các acid béo khác nhau về độ dài của chuỗi carbon và độ bão hòa, nghĩa là số lượng liên

kết đôi trong phân tử. Những đặc điểm này ảnh hưởng đến đặc tính hóa học của acid béo. Có thể thay đổi chất béo theo hai hướng sau:

- Thứ nhất là thay đổi tỷ lệ acid béo bão hòa và chưa bão hòa, thứ hai là tạo ra những acid béo có mạch carbon dài, chưa bão hòa, vì chúng được coi là thực phẩm có giá trị. Ví dụ: một gen từ *Umbellularia californica* mã hóa cho enzyme thioesterase được đưa vào cây cải dầu, đã tăng hàm lượng lauric acid ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$), thuận lợi cho việc sản xuất bơ.



Hình 2.6. Cấu trúc của (a) cellulose, (b) amylose (không phân nhánh) và (c) amylopectin (phân nhánh).

- Tuy nhiên, thay đổi acid béo trong thực phẩm cũng có khó khăn vì có những trường hợp cho thấy, một số acid béo mới xuất hiện có ảnh hưởng xấu đến ngành chăn nuôi. Vì vậy, để có sự phát triển thích hợp phải thực hiện các nghiên cứu về độ an toàn. Điểm chính trong thay đổi acid béo là hướng về các mục đích công nghiệp, ví dụ các chất thay thế cho dầu tự nhiên.

2.2.2. Hàm lượng protein và amino acid không thay thế

Hàm lượng protein và thành phần amino acid thay đổi rất nhiều trong thực phẩm thực vật. Ngoài protein thì các amino acid không thay thế, phải được tiếp nhận cùng thức ăn vì con người và động vật không tự tổng hợp được. Đặc biệt trong thức ăn gia súc chủ yếu là đậu tương và ngô, phải bổ sung các amino acid được sản xuất bằng phương pháp lên men như lysine, methionine, threonine và tryptophan. Trong tương lai không cần thiết phải bổ sung các amino acid này theo cách như vậy mà tạo dòng các gen ở cây đậu tương hoặc ngô mã hóa cho protein giàu những amino acid này.

Một trong những thành công đầu tiên là tạo dòng ngô đột biến có cân bằng amino acid tốt hơn (hàm lượng protein cao hơn) có tên là Opaquez, có hàm lượng lysine cao hơn (tăng 32% so với đối chứng). Năm 1960, các nhà khoa học đã chứng minh được ưu thế dinh dưỡng của loại ngô này, nhưng người nông dân đã không chấp nhận vì năng suất giảm 15%. Thực tế này đã dẫn tới sự cố gắng trong lai tạo giống trong 30 năm để tạo ra được dòng ngô chứa protein chất lượng cao. Hàm lượng lysine của loại này không cao như Opaque2 (20% so với 32%), nhưng có những đặc điểm nông học tốt. Nông dân ở châu Phi và Nam Mỹ, nơi mà ngô là lương thực chính cho con người đã chấp nhận rộng rãi giống ngô này.

Trong hạt đậu tương hàm lượng protein cao nhưng nghèo methionine. Những cố gắng để tạo ra cây họ đậu giàu methionine bằng công nghệ gen đã xác định được một protein trong hạt hướng dương chứa các amino acid có lưu huỳnh cao bất thường. Một đặc tính khác của protein này là bền trước sự phân giải vi khuẩn trong dạ cỏ. Một nhà nghiên cứu người Úc đưa gen mã hóa cho protein vào cây đậu lupin với mục đích biểu hiện ở hạt. Kết quả là

tăng 100% hàm lượng protein trong hạt. Khi dùng hạt này để nuôi cừu, trọng lượng cừu tăng 7% và sản lượng lông tăng 8% so với cừu nuôi bằng loại hạt bình thường. Thành công này thúc đẩy các nhà nghiên cứu đưa gen này vào lá cây cỏ, nhằm cải tiến cân bằng amino acid không thay thế ở dạ cỏ.

Thaumatococin là những protein được chiết xuất từ thịt quả của cây *Thaumatococcus daniellii*, có độ ngọt gấp 1.000 lần đường saccharose. Người ta đã thành công trong việc chuyển một gen mã hóa cho thaumatococin (thaumatococin II) vào cây khoai tây, tạo một cây khoai tây có lá, thân rễ, củ đều ngọt. Kết quả này mở ra một triển vọng rất lớn đối với cây ăn quả ngọt.

Cây trồng chuyển gen có khả năng sản xuất những loại protein mới. Việc sản xuất protein trong thực vật dễ dàng, nhưng tinh sạch những protein này từ mô thực vật là khó khăn và trước hết là giá thành cao. Vì vậy, người ta hy vọng vào một phương pháp mới, được giới thiệu bởi Raskin và cộng sự (1999). Những gen mã hóa cho protein được gắn với một promoter và đảm bảo cho protein chỉ được tổng hợp ở rễ. Tiếp theo, protein tạo thành có một hệ thống tín hiệu, đảm bảo cho nó được vận chuyển vào một vị trí xác định trong tế bào. Trong trường hợp đặc biệt protein được vận chuyển vào mạng lưới nội chất (endoplasmic reticulum: ER). Protein đi vào ER có thể được tiết ra bên ngoài và chỉ ở vùng rễ, vì promoter chỉ đặc hiệu cho vùng này. Người ta có thể dùng một số dung dịch muối để tách protein một cách dễ dàng và với giá thành hợp lý.

Một ví dụ khác cho hướng ứng dụng này là đã tạo ra được hai loại thuốc lá chuyển gen, mỗi loại có khả năng sản xuất một trong hai mạch immunoglobulin nhẹ và nặng. Thế hệ con sinh ra nhờ lai hai loại cây trên biểu hiện được một kháng thể hoạt động gồm hai loại mạch với hàm lượng cao (chiếm 1,3% protein hòa tan tổng số của lá) và có tất cả các đặc tính của một kháng thể đơn dòng sản sinh từ hybridoma.

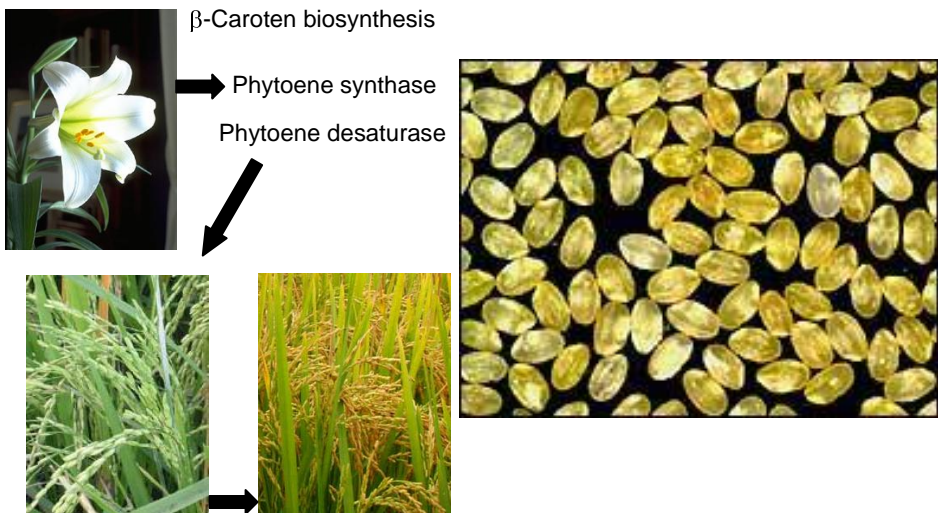
2.2.3. Vitamin, chất khoáng và các nguyên tố vi lượng

Vitamin, chất khoáng và các nguyên tố vi lượng rất cần cho sức khỏe con người và phải được đưa vào cùng với thức ăn. Vấn đề này ở các nước công nghiệp thực hiện rất dễ dàng, trong khi ở các nước đang phát triển lại là sự thiếu hụt rất lớn. Hằng năm có khoảng 250 triệu trẻ em thiếu vitamin

A, 250.000-500.000 trẻ em bị mù. Hai tỷ người, một phần ba dân số thế giới thường xuyên thiếu Fe, con số này còn tăng lên khi lương thực chính là gạo.

Thực vật là nguồn cung cấp vitamin, chất khoáng và các nguyên tố vi lượng, trừ vitamin B₁₂ và D. Các thực vật khác nhau có lượng vitamin và chất khoáng khác nhau. Gạo là lương thực chính cho con người hầu như không chứa vitamin A. Thực vật được sử dụng ăn sống có ý nghĩa đối với việc cung cấp vitamin, vì phần lớn vitamin không chịu nhiệt.

Ở đây nêu hai ví dụ về Fe và vitamin A cũng như β -carotene. Gần đây đã thành công ở cây lúa biến đổi gen, có đủ hàm lượng β -carotene (trong cơ thể người nó được biến đổi dễ dàng thành vitamin A) và hàm lượng Fe hấp thu được cũng cao hơn. Nếu giống lúa này được sử dụng, tình trạng dinh dưỡng của hàng tỷ người được nâng lên rõ rệt. Giới báo chí gọi giống lúa này với cái tên “lúa vàng”.



Hình 2.7. Lúa vàng “gold rice”. Giống lúa mới này được sản xuất bằng công nghệ gen. Hạt có màu vàng vì provitamin A được tạo ra trong toàn hạt (thay vì nằm ở vỏ ngoài của lúa không biến đổi gen).

Để đạt được chất lượng trên, 7 gen khác nhau được biến nạp vào cây lúa. Số lượng này tương đối lớn và được thực hiện trong hai bước. Ở hạt gạo

không chứa β -carotene, nhưng người ta thấy có hợp chất geranyl-geranylpyrophosphate, chất này được biến đổi thành β -carotene trong một trình tự gồm 4 phản ứng enzyme. Bốn gen cần thiết ở đây được phân lập từ vi khuẩn, thực vật và được biến nạp vào cây lúa thông qua *A. tumefaciens*. Chúng được nối thêm trình tự điều khiển để đảm bảo cho gen được biểu hiện trong nội nhũ. Vì vậy tiền vitamin A không bị mất đi khi xay xát. Nội nhũ bây giờ có màu vàng là do β -carotene. Ba trăm gam gạo này chứa đủ lượng β -carotene, đáp ứng nhu cầu hàng ngày của con người.

Bốn enzyme cần thiết là: phytoen-synthase, phytoen-desaturase, ζ -carotin-desaturase và lycopene- β -cyclase.

Ở nước ta, Viện nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu long đã tiến hành nghiên cứu tạo được nhiều dòng lúa giàu β -carotene, vitamin E và γ -oryzanol bằng phương pháp chuyển nạp gen qua trung gian *A. tumefaciens* và chọn lọc bằng mannose thay thế cho hệ thống chọn lọc bằng chất kháng sinh hoặc chất diệt cỏ. Kết quả nghiên cứu này còn có ý nghĩa trong việc tạo ra các dòng lúa biến đổi gen sạch, khắc phục các mối lo ngại về tính an toàn của cây biến đổi gen hiện nay.

Song song một giống lúa thứ hai được tạo ra, chứa ba gen làm tăng sự cung cấp Fe.

Phytate (myo-inositol-hexaphosphate) là một dạng phosphore dự trữ trong hạt ngũ cốc và hạt cây họ đậu. Khi hạt nảy mầm xuất hiện enzyme phytase giải phóng phosphate từ inositol. Tuy nhiên, những hạt không nảy mầm hoặc động vật trong hệ thống tiêu hóa không có phytase hoạt động ở mức độ đáng kể thì động vật phải sử dụng phosphate rất nghèo trong hạt.

Phytate là yếu tố dinh dưỡng đối kháng vì nó kết hợp với Zn, Fe và các nguyên tố khoáng khác. Phytate kết hợp với Fe làm cho 95% Fe có trong thực phẩm không sử dụng được. Đối với nhóm người sử dụng chủ yếu là gạo, đặc biệt thiếu Fe do phytate.

Để vượt qua vấn đề này người sản xuất thường xuyên cho thêm phytase của nấm để chuẩn bị thức ăn vì phytase này bền với nhiệt, phân giải phytate trong gạo.

Gần đây, các nhà nghiên cứu tạo ra giống lợn biến đổi gen, có thể tiết ra phytase vào nước bọt để tiêu hóa phytate trong thức ăn của chúng.

Những nghiên cứu tiếp theo là tìm kiếm những hạt đột biến dự trữ phosphate vô cơ hơn là phytate. Các nhà nghiên cứu đã xác định được dòng ngô có phytate thấp. Người và động vật ăn ngô này tăng được khả năng hấp thụ Fe.

Người ta cũng tìm thấy hai gen từ thực vật, một gen làm tăng sự tích lũy Fe trong gạo (ferritin) và gen khác tăng sự hấp thụ Fe (protein giàu cystein, tương tự metallothionine) trong cơ thể người.

Bằng sự lai tạo giữa hai giống lúa này đã xuất hiện một giống có hàm lượng β -carotene cao cũng như chứa nhiều Fe và độ hấp thụ Fe cũng tăng lên.

Hầu hết dầu của hạt chứa γ -tocopherol, một tiền chất không hoạt động của α -tocopherol. Biến đổi dạng $\gamma \rightarrow \alpha$ là gắn thêm một nhóm $-\text{CH}_3$ (methyl). Gần đây, các nhà khoa học đã phân lập được gen mã hóa cho enzyme xúc tác phản ứng methyl hóa này ở trong mô thực vật, sau đó đã gắn gen với promoter đặc hiệu ở hạt và đưa vào cây thử nghiệm (test-plant). Kết quả là 95% tocopherol ở dạng hoạt động (methyl hóa), tăng 80 lần hàm lượng vitamin E. Ứng dụng kết quả này cho cây có dầu hứa hẹn sự cải thiện tốt vitamin E cung cấp cho người và động vật.

2.2.4. Tăng khả năng bảo quản và hương vị

Ở các nước công nghiệp yêu cầu về lượng quả, rau và salad rất lớn cho từng mùa trong năm. Sự cung cấp vitamin cho con người trong mùa đông cũng được đảm bảo. Đáp ứng được nhu cầu này là do một phần thực phẩm tươi được vận chuyển đến từ những nơi rất xa. Thời gian vận chuyển dài nên khó khăn trong việc bảo quản nông sản tươi, vì quả chín mềm rất nhanh và không còn giá trị, đặc biệt đối với chuối và cà chua. Vì vậy, quả phải được thu hoạch xanh và quá trình chín xảy ra trong khi vận chuyển và bảo quản. Sự chín được thực hiện nhanh trước khi đưa ra thị trường bằng xử lý ethylene. Trường hợp này làm ảnh hưởng đến mùi vị của quả. Cà chua sẽ ngon hơn nếu thu hoạch khi quả chín, như vậy có thời gian lưu giữ ngắn. Với phương pháp biến đổi gen có thể kéo dài thời gian cất giữ quả.

Đặc điểm tự nhiên của cà chua là chín rữa để giải phóng hạt. Trong quá trình này cây sản sinh ra enzyme phân giải thành tế bào làm cho quả chín. Trong các enzyme có polygalacturonase. Bằng phương pháp tạo dòng gen (antisense-polygalacturonase) enzyme này không được tổng hợp và nhờ

vậy mà cà chua giữ được lâu hơn. Tuy nhiên, sau đó cà chua sẽ chín do còn có những enzyme khác phân giải thành tế bào. Loại cà chua này trên thị trường được gọi với tên là Flavor Savor.

Ưu điểm đối với người sản xuất là thu hoạch đơn giản và bảo quản được lâu hơn và đối với người tiêu dùng là chất lượng tốt hơn. Những thành phần khác, ví dụ như vitamin, theo phân tích cho đến nay là không thay đổi. Tuy nhiên, trong cà chua này có gen kháng kanamycin và giá cà chua này còn cao nên chưa phổ biến trên thị trường.

2.2.5. Giảm các chất gây dị ứng

Dị ứng là một vấn đề lớn trong xã hội hiện đại, nguyên nhân gây ra cho đến nay khoa học vẫn còn tranh cãi. Thường thì dị ứng là do thức ăn hoặc các thành phần của nó. Đặc biệt là dị ứng đối với hạt dẻ, quả kiwi hoặc đậu tương. Gần đây dị ứng với hạt dẻ và đậu tương đang được quan tâm, vì nó có trong nhiều loại sản phẩm và gây ra dị ứng nguy hiểm cho con người. Người ta ước lượng có khoảng 20.000 sản phẩm trong thành phần có chứa đậu tương.

Cho đến nay biện pháp duy nhất chống lại dị ứng và những chứng khó tiêu hóa khác là tránh tiếp nhận những thực phẩm gây dị ứng. Điều đó làm giảm chất lượng sống. Vì phần lớn chỉ một chất trong thực phẩm gây ra dị ứng nên biện pháp tốt hơn là loại bỏ chất này. Vấn đề cần thiết là xác định protein hoặc những hợp chất gây ra dị ứng và giải thích sự tổng hợp của chúng trong cây. Với kỹ thuật gen người ta có thể biến đổi hoặc làm ngừng tổng hợp enzyme, tạo ra cây biến đổi gen với khả năng dị ứng thấp hơn. Để đạt được mục đích này nhiều dự án đang được tiến hành. Ví dụ: gen mã hóa cho protein gạo gây dị ứng được phân lập. Đó là một protein tương tự với chất ức chế α -amylase/trypsin của lúa mì và yến mạch. Bằng phương pháp antisense đã giảm được lượng protein gây dị ứng trong gạo.

2.2.6. Vaccine thực phẩm

Gần đây, các nhà khoa học đã coi cây trồng như một nguồn cung cấp các loại vaccine phòng bệnh, bởi vì những loại vaccine thông thường đòi hỏi phải được bảo quản trong môi trường lạnh, điều vô cùng khó khăn ở những nơi xa xôi của các nước đang phát triển. Một nghiên cứu gần đây đã công bố

một bước đột phá trong lĩnh vực sản xuất vaccine từ thực vật, đó là kết quả nghiên cứu của Thanavala và Arntzen (Mỹ) về khả năng gây miễn dịch trong cơ thể người bằng vaccine thực phẩm để điều trị bệnh viêm gan B. Loại cây trồng để chuyển gen kháng nguyên lấy từ virus viêm gan B là khoai tây. Nhờ đó loại khoai tây này có khả năng kháng virus viêm gan B bằng cách tạo ra kháng nguyên virus. Các nhà nghiên cứu hy vọng rằng khi ăn loại khoai tây này, chất kháng nguyên sẽ gây ra một phản ứng miễn dịch nhẹ trong cơ thể người. Từ đó, cơ thể người sẽ tạo ra chất miễn dịch cá thể đối với bệnh lây nhiễm viêm gan B.

Loại khoai tây chuyển gen, chứa vaccine ngừa viêm gan B, đã thúc đẩy thành công khả năng miễn dịch trong các cuộc thử nghiệm lâm sàng đầu tiên. Theo đó, hơn 60% tình nguyện viên đã ăn khoai tây chuyển gen (tương đương ba liều vaccine) và kết quả là cơ thể họ tạo thêm một lượng lớn kháng thể chống lại virus. Tình nguyện viên ăn khoai tây bình thường không sinh thêm kháng thể. Tuy nhiên, do những người ăn sống khoai tây chuyển gen đã được tiêm vaccine viêm gan B thông thường nên vaccine khoai tây chỉ tăng cường khả năng miễn dịch của họ.

Việc biến thực phẩm thành nguồn vaccine rẻ tiền rất hữu ích đối với các nước nghèo vì không phải chi phí cho bảo quản lạnh hoặc mua kim tiêm. Như vậy thì các nhà dược phẩm đang từ bỏ việc bào chế vaccine từ các loại thực phẩm cơ bản như chuối, cà chua và khoai tây. Nguyên nhân làm họ lo ngại là thực phẩm chứa vaccine có thể bị lẫn vào thực phẩm trong siêu thị hoặc cửa hàng.

Thay vào đó, các nhà bào chế thuốc đang tập trung vào sản xuất vaccine trong lá cây ăn được, song thực vật đó không được bán làm thực phẩm. Nhóm nghiên cứu của Arntzen đang điều tra một số thực vật và hứa hẹn nhất là cây *Nicotiana benthamina*, họ hàng của cây thuốc lá. Lá được thu hoạch, rửa sạch, nghiền rồi ướp lạnh, sấy khô để bảo quản trước khi đóng vào các viên con nhộng.

Ướp lạnh, sấy khô có nghĩa là vaccine tồn tại trong thời tiết nóng, không cần bảo quản lạnh giống như vaccine thông thường. Ngoài ra, đóng vaccine thành viên con nhộng đảm bảo liều lượng thống nhất. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cho biết rất quan tâm tới phương pháp bào chế vaccine dạng này. Tuy nhiên, vẫn chưa rõ liệu vaccine có an toàn và hiệu quả đối

với người hay không. Số người không phản ứng với vaccine trong thực vật chuyển gen cao hơn nhiều so với vaccine thông thường.

2.3. Những ứng dụng mới của cây trồng-nguồn nguyên liệu và cải tạo đất

Khoáng sản thu được trong công nghiệp ở dạng quặng, dầu, khí... và thường sau đó được tinh chế và biến đổi hóa học. Nhiều khoáng sản trong tự nhiên có giới hạn và sẽ cạn dần trong tương lai. Một trong những suy nghĩ cách mạng nhất là sử dụng cây biến đổi gen để cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp: carbohydrate, chất béo và thậm chí là chất tổng hợp. Những cây này được trồng, thu hoạch và sử dụng làm nguyên liệu cho công nghiệp hóa học. Hiện nay, nhiều dự án theo hướng này đang được thực hiện.

2.3.1. Carbohydrate và acid béo là nguồn nguyên liệu

Trong tương lai tinh bột biến đổi cho sản xuất chất dính và nguyên liệu cho các mục đích khác có ý nghĩa trong công nghiệp. Cellulose là nguyên liệu cần cho sản xuất giấy và pectin cần cho chất keo và chất làm kín. Thay đổi hướng trao đổi chất có thể tăng tỷ lệ một carbohydrate nào đó và cây biến đổi gen sẽ tạo ra một lượng lớn chất này. Đây cũng là một đóng góp quan trọng để bảo vệ môi trường.

Chất béo và dầu là những nguyên liệu công nghiệp quan trọng. Cho đến nay chất béo và dầu thu được từ thực vật chưa đáp ứng nhu cầu. Ví dụ hằng năm khoảng 80% mỡ và dầu (khoảng 75 triệu tấn) dùng cho sản xuất thực phẩm, và chỉ có 15 triệu tấn sử dụng cho công nghiệp. Một nguyên nhân là do chất béo và dầu có giá cao gấp đôi so với dầu công nghiệp.

Sự tổng hợp chất béo là một quá trình phức tạp, xảy ra ở trong nhiều vị trí khác nhau của tế bào. Thực tế cho thấy, tổng hợp một acid béo nào đó đạt cao hơn, khi chất này được vận chuyển và tích lũy vào vật chứa phù hợp (ví dụ: hạt). Về thay đổi thành phần chất béo đã có một loạt các dự án, ví dụ làm giảm độ no các acid béo của cây cải dầu bằng kỹ thuật antisense hoặc sử dụng các gen để tạo nên petroselic acid, cho mục đích sản xuất polymer. Sự kéo dài chuỗi carbon của acid béo để sản xuất dầu mỡ cho máy móc và chất làm mềm.

2.3.2. Chất tổng hợp

Nhiều loài vi khuẩn tạo ra chất dự trữ là polyester, ví dụ polyhydroxy acid butyric [poly (3HB)]. Chất này không độc và có thể phân giải hoàn toàn bằng phương pháp sinh học. Chúng có đặc điểm tương tự polypropylene và vì vậy phù hợp cho sản xuất plastic. Ngoài việc sản xuất “bioplastic” trong vi khuẩn, gần đây người ta đã bắt đầu tạo cây chuyển gen để sản xuất hợp chất poly (3HB). Vấn đề này bước đầu đã không thành công, cây đã tạo ra được poly (3HB), tuy nhiên cây biểu hiện sự phát triển kém. Khi người ta chuyển 3 gen mã hóa cho poly (3HB) có nguồn gốc từ *Ralstonia eutropha* vào lạp thể của *Arabidopsis thaliana* thì thu được cây phát triển bình thường và sản sinh ra poly (3HB) và chất này đạt đến 14% khối lượng khô. Một sự cải tiến tiếp theo được thực hiện trong một nghiên cứu mới bằng việc sử dụng 4 gen. Ở *Arabidopsis thaliana* và cây cải dầu, chất trung gian để tổng hợp chất béo và amino acid được biến đổi để tổng hợp plastic có hiệu quả hơn.

2.3.3. Protein thực vật

Việc sản xuất protein trong thực vật dễ dàng, nhưng làm sạch protein từ mô thực vật khá khó khăn và trước hết là giá thành cao. Vì vậy, người ta hy vọng vào một phương pháp mới, được giới thiệu bởi Raskin và cộng sự năm 1999. Những gen mã hóa cho protein được gắn với một promoter và đảm bảo cho protein chỉ được tổng hợp ở rễ. Tiếp theo protein tạo thành có một hệ thống tín hiệu, đảm bảo cho nó được vận chuyển vào một vị trí xác định trong tế bào. Trong trường hợp đặc biệt protein được vận chuyển vào mạng lưới nội sinh chất.

Protein đi vào mạng lưới nội chất (ER) có thể được thải ra bên ngoài và chỉ ở vùng rễ, vì promoter chỉ đặc hiệu cho vùng này. Người ta dùng một số dung dịch muối để tách protein một cách dễ dàng và với giá thành hợp lý.

2.3.4. Cải tạo đất

Nồng độ chất độc cao (kim loại nặng hoặc các chất thải) ở trong đất thường là hậu quả của quá trình sản xuất công nghiệp. Các chất này phải được đốt cháy hoặc phân giải nhờ vi khuẩn. Các quá trình này đắt tiền và nguy hiểm cho người lao động. Vì vậy, gần đây cây biến đổi gen đã được sử dụng để loại bỏ các chất độc. Năm 1999, lần đầu tiên đã thành công trong

việc sử dụng cây chuyển gen để phân giải TNT (trinitrotoluene), trong đó người ta tạo dòng gen sản xuất enzyme vi khuẩn (pentathritol-tetranitratreductase) trong cây thuốc lá, enzyme này phân giải TNT và chất tương tự GTN (glyceryl trinitrate) thành những chất không độc.

Tiếp theo, người ta đã chuyển một gen vi khuẩn mã hóa cho enzyme phân giải thủy ngân Hg-reductase vào cây họ hàng với một lan. Cây này hút ion Hg từ đất và biến đổi nó thành kim loại ít độc hơn. Việc loại các kim loại nặng như chì, uranium và cadmium với cây biến đổi gen đã được thực hiện. Với hệ thống rễ một số loại thực vật có thể hút các kim loại và tích lũy trong các phần trên mặt đất của nó, những phần này sau đó được loại trừ dễ dàng. Một phương thức để nâng cao các quá trình tự nhiên là tăng cường hô hấp của cây, vì kim loại nặng cùng với dòng nước đi lên các bộ phận trên mặt đất.

2.4. Cây dược liệu

Thực vật chứa một lượng lớn các hợp chất có nguồn gốc thứ cấp, có cấu tạo hóa học không đồng nhất và tạo nên một sự đa dạng. Tác dụng chữa bệnh của một số thực vật đã được biết từ lâu, và thực tế tác dụng của chúng là nhờ vào các hợp chất thứ cấp tồn tại trong cây, ví dụ thuốc asparin được sản xuất từ acid salicylic có trong loại cỏ tự nhiên.

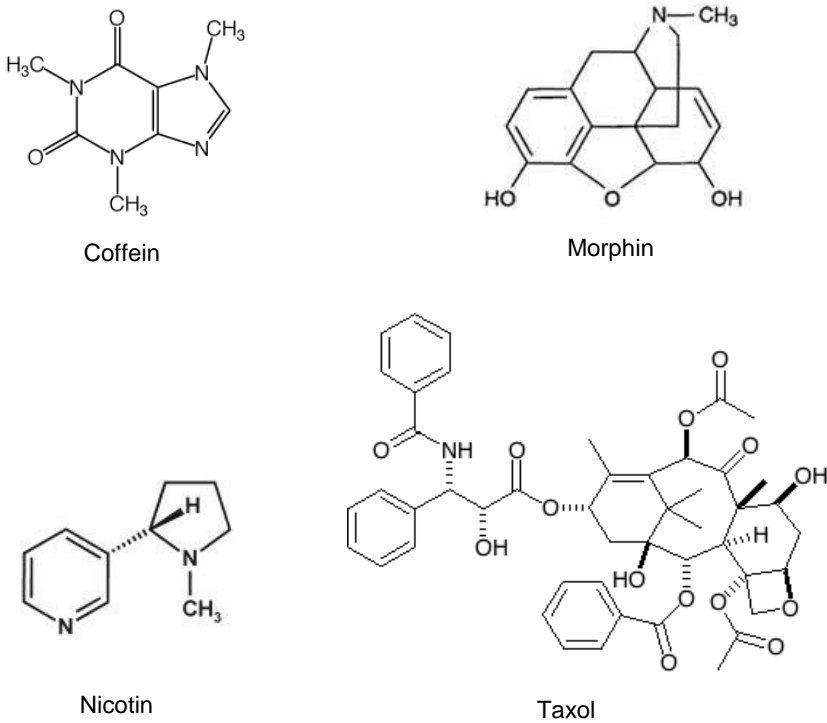
Các công ty dược thực hiện sự tìm kiếm rộng rãi và tốn kém các hợp chất tự nhiên có dược tính. Những chất này được tìm ra, phân tích cấu tạo hóa học và được tổng hợp nhân tạo. Rừng nhiệt đới và san hô ngầm ở biển là nguồn tiềm năng đối với các dược liệu vẫn còn chưa biết.

2.4.1. Alkaloid

Khái niệm alkaloid bắt nguồn từ chữ Ả rập và biểu diễn các chất có trong thực vật chứa nitrogen, phần lớn là dị vòng và có tính kiềm. Năm 1806, alkaloid đầu tiên được phân lập là morphin từ cây nha phiến (*Papaver somniferum*). Từ đó đến nay hơn 10.000 alkaloid khác nhau được tìm thấy và đã biết công thức cấu tạo. Một số được minh họa trong hình 2.8. Rất nhiều chất trong đó là chất độc, giảm đau hoặc chữa bệnh (ví dụ: atropin hoặc morphin) có ý nghĩa trong y học hoặc là chất kích thích (ví dụ: coffein hoặc nicotin). Có ý nghĩa trong chữa bệnh ung thư là các alkaloid như taxol, đã thu được từ *Taxus brevifolia*.

Trong tiến trình lịch sử con người đã sử dụng khoảng 13.000 loài thực vật dược liệu và ngày nay nhiều sản phẩm thực vật còn đóng một vai trò quan trọng trong y học. Từ nhiều dược liệu tự nhiên mà các loại thuốc được tổng hợp, ví dụ như cấu tạo của atropin là cơ sở để tổng hợp tropicamid.

Để có được những cây biến đổi gen với sự hàm lượng alkaloid cao hơn trước hết phải xác định được các enzyme và các gen mã hóa của chúng. Một số gen mã hóa cho enzyme tổng hợp alkaloid đã được biết và đã tạo dòng đạt được kết quả đầu tiên, ví dụ ở cây cà diên (*Atropa belladonna*) enzyme hyoscyamin-6 β -hydroxylase biểu hiện đã biến đổi hyoscyamin (tương ứng atropin) thành scopolamin. Trong lá và chồi của chúng tìm thấy hầu hết là scopolamin. Thị trường có nhu cầu lớn về scopolamin, vì chất này thích hợp cho những biến đổi tiếp theo.



Hình 2.8. Công thức cấu tạo của một số alkaloid có ý nghĩa.

Trong tương lai thực vật biến đổi gen với sự tổng hợp alkaloid thay đổi càng có ý nghĩa, đặc biệt là những gen của một số quá trình tổng hợp

hoàn toàn đã biết. Tuy nhiên, điều quan trọng là những hiểu biết về gen và enzyme tổng hợp các alkaloid khác phải được giải thích trước hết bằng những nghiên cứu cơ bản.

2.4.2. Chất miễn dịch

Tiêm chủng nhằm mục đích chống lại những tác nhân gây bệnh nguy hiểm như vi khuẩn và virus. Trước đây bệnh đậu mùa, bệnh lao, hoặc bệnh bại liệt là mối nguy hại lớn, ngày nay nhờ các biện pháp phòng ngừa và đặc biệt nhờ tiêm chủng mà ít nhất là ở các nước công nghiệp các bệnh này không còn nữa, tuy nhiên ở các nước đang phát triển vẫn còn là vấn đề. Chất miễn dịch thường được thu từ động vật hoặc từ tế bào nuôi cấy. Những năm gần đây chất tiêm chủng (vaccine) được sản xuất từ thực vật. Ưu điểm lớn nhất là sự nhiễm bẩn với virus gây bệnh cho người và những tác nhân gây bệnh khác không xảy ra, vì chúng không tồn tại ở thực vật.

Cần phân biệt tiêm chủng miễn dịch chủ động và bị động. Ở miễn dịch chủ động tác nhân gây bệnh được làm yếu hoặc protein được sử dụng. Ngược lại, ở miễn dịch bị động là kháng thể đã được tinh sạch. Cả hai phương pháp đang được thử nghiệm trong hệ thống biểu hiện thực vật.

Một trong những nguyên nhân gây chứng sâu răng là do vi khuẩn *Streptococcus mutans*. Để gắn dính vi khuẩn này cần có protein dính đặc hiệu. Gen *spaA* mã hóa cho protein này được tạo dòng và biểu hiện trong cây thuốc lá. Trong thuốc lá chuyển gen protein *spaA* chiếm đến 0,02% tổng số protein lá. Người ta hy vọng một sự tiếp nhận thức ăn thực vật chứa protein này có thể tạo ra phản ứng miễn dịch.

Bằng cách tương tự trong khoai tây tiểu phần B của cholera toxin có nguồn gốc từ *Vibrio cholerae* được biểu hiện. Protein này chiếm đến 0,3% protein hòa tan tổng số trong cây.

Khoai tây thường phải được nấu, nên miễn dịch không có hiệu quả, vì vậy cơ chế này được thử nghiệm ở cà chua. Một glycoprotein của virus gây bệnh chó dại được biểu hiện ở lượng nhỏ trong cây cà chua và trong thử nghiệm đã tìm thấy được một kháng thể đơn dòng. Điều này chứng tỏ khả năng sản xuất protein và năng lực của phương pháp này. Ở salad chất miễn dịch cũng được biểu hiện. Sự lựa chọn cây trồng thích hợp nhất là trọng tâm của những nỗ lực. Một vấn đề nữa là lượng chính xác đối với người phải được kiểm tra chặt chẽ.

Phức tạp hơn là sản xuất kháng thể trong thực vật. Kháng thể có ý nghĩa quan trọng ở phản ứng miễn dịch của động vật có xương sống. Đặc tính đặc biệt của kháng thể là có ái lực lớn với chất xác định gọi là kháng nguyên.

Ưu điểm lớn nhất của hệ thống biểu hiện thực vật so với vi khuẩn về sản xuất kháng thể là ở khả năng kết hợp và hình thành cấu hình chính xác của protein phức tạp. Hệ thống này rất có hiệu quả vì protein với hệ thống tín hiệu phù hợp đã tích trữ ở trong mạng lưới nội chất. Tuy nhiên trong mạng lưới nội chất của thực vật và động vật có vú cơ chế kết hợp và hình thành cấu trúc được duy trì, đảm bảo cho protein có chức năng chính xác. Kết quả cho thấy có đến 6,8% protein hòa tan trong thực vật là kháng thể và lượng này có thể được tiếp nhận cùng với thức ăn.

Trước hết trong thực vật một phần của kháng thể, ví dụ như Fab- và Fv-fragment, đã được biểu hiện. Gần đây, người ta đã thu được kháng thể hoàn chỉnh, như kháng thể chống lại virus type 2 *Herpes-simplex*, một kháng thể của Adenocarcinome ở người và một kháng thể của protein kết dính *Streptococcus mutants*. Kháng thể cuối có tên gọi là Guy's 13, đã có tác dụng ở người. Kết quả thử nghiệm cho thấy sự phát triển của vi khuẩn này ở răng bị ức chế.

Trong tương lai sẽ có nhiều ứng dụng trong y học. Ngoài ra, kháng thể sẽ được sử dụng để chống lại tác nhân gây bệnh ở thực vật. Thú vị là đặc điểm của một số kháng thể sau khi kết hợp, ức chế chức năng của kháng nguyên (antigen). Vì cơ chế này thể hiện trong tế bào sống, cho phép sử dụng kháng thể để bảo vệ cây trồng. Phát triển các cây kháng bệnh, trong đó các kháng thể đặc hiệu biểu hiện.

2.5. Thực vật biến đổi gen

Hoa và cây cảnh có ý nghĩa kinh tế rất lớn. Thường người ta chỉ nghĩ đến doanh thu ở các vườn, việc kinh doanh hoa, công viên... Ngược lại, công nghệ gen có thể đưa lại những thay đổi về dạng và màu hoàn toàn mới, vì phương pháp truyền thống đã đạt đến giới hạn. Khả năng này dựa vào việc ứng dụng các kết quả nghiên cứu cơ bản về tạo màu và dạng hoa.

2.5.1. Thay đổi màu hoa

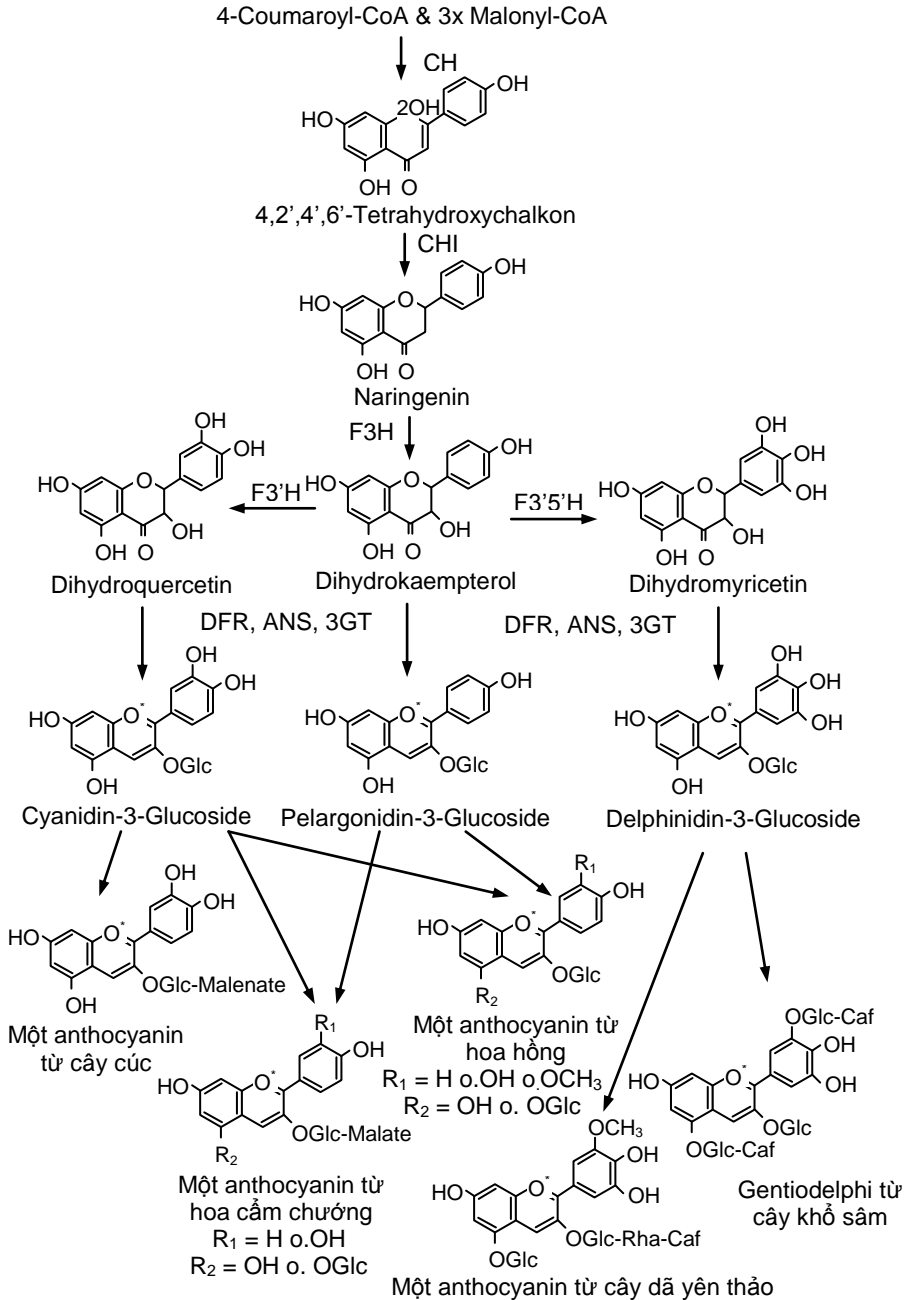
Màu hoa được xác định chủ yếu do nồng độ của các chất như flavonoid, carotinoid và betalain. Trong khi carotinoid (màu vàng/cam) quy định màu vàng của cánh hoa hướng dương, người ta thấy betalain (màu vàng/đỏ) đại diện ở họ cây xương rồng. Vùng màu nhiều nhất là ở flavonoid, màu vàng, đỏ, đỏ thẫm, xanh. Các flavonoid có đặc điểm chung là bắt nguồn từ khung cơ bản (Hình 2.9). Thể hiện các màu khác nhau là do anthocyanin, có nguồn gốc từ khung cơ bản và được tích lũy trong không bào. Đặc biệt có ý nghĩa là pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin và petunidin. Những màu bắt nguồn từ tên các cây mà từ đó chúng được phân lập ra. Do sự hydroxyl hóa (gắn các nhóm OH), glycosyl hóa (gắn gốc đường) hoặc acetyl hóa (gắn một nhóm acetyl) đã đạt được sự đa dạng về màu sắc. Sự đa dạng này còn do các yếu tố khác như pH của không bào, tạo phức hệ kim loại và hình dạng tế bào. Cho đến nay, hàng trăm anthocyanin từ thực vật được tinh sạch và xác định cấu trúc hóa học. Chức năng sinh học là hấp dẫn côn trùng trong việc thụ phấn.

Sự tổng hợp các flavonoid đã được biết chính xác và đưa ra khả năng thay đổi màu bằng kỹ thuật gen. Điều kiện là phần lớn các gen tham gia phải được xác định. Những gen tương ứng từ thực vật họ hàng có thể được phân lập dễ dàng bằng phương pháp lai phân tử. Ngoài ra còn có khả năng trao đổi các gen tổng hợp các flavonoid cũng như các anthocyanin giữa các loại thực vật. Ví dụ: ở Đức, cây dã yên thảo biến đổi gen là thí nghiệm đầu tiên được đưa ra ngoài. Sau đó, những gen điều khiển tổng hợp màu này cũng đã biết.

Sự thay đổi màu hoa ở cây biến đổi gen là do sự biểu hiện của một gen tổng hợp nào đó mà ở cây bình thường không có hoặc ở mức thấp. Ở đây sử dụng phương pháp antisense hoặc là đồng ức chế (mục 1.5.2 và 1.6.2). Các ví dụ cho những thay đổi thành công về màu hoa tổng kết lại ở bảng 2.2.

Quá trình sinh tổng hợp flavonoid được tổng quát như sau: Bước đầu tiên tổng hợp flavonoid được xúc tác bởi enzyme chalcon-synthase (CHS) và tạo nên 4, 2', 4', 6'-tetrahydroxychalcon (Hình 2.9), chất này tiếp tục được biến đổi thành naringenin nhờ enzyme chalcon-isomerase (CHI). Enzyme flavonon-3-hydroxylase (F3H) thủy phân naringenin thành dihydrokaempferol. Chất này là điểm khởi đầu cho tổng hợp nhiều flavonoid khác. Đặc biệt có ý nghĩa là flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) và

flavonoid-3',5'-hydroxylase. Chúng là những enzyme quan trọng trong việc xác định màu hoa, vì chúng xúc tác cho sự hydroxyl hóa khác nhau của dihydrokaempferol và cuối cùng tạo nên anthocyanidine, chất này được thay đổi bằng cách gắn thêm đường (Glc) hoặc các nhóm thơm (Caf).



Hình 2.9. Tổng hợp flavonoid. ANS: anthocyanidinsynthase, Caf: caffeic acid, CHS: chalconsynthase, CHI: chalconisomerase, DFR: dihydroflavonol-4-reductase, F3H: flavanon-3-hydroxylase, F3'H: flavonoid-3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid-3',5'-hydroxylase, Glc: glucose, 3GT: flavonoid-3-glucosyltransferase, Rha: rhamnose.

Bảng 2.1. Một số ví dụ về cây biến đổi gen với màu sắc hoa thay đổi.

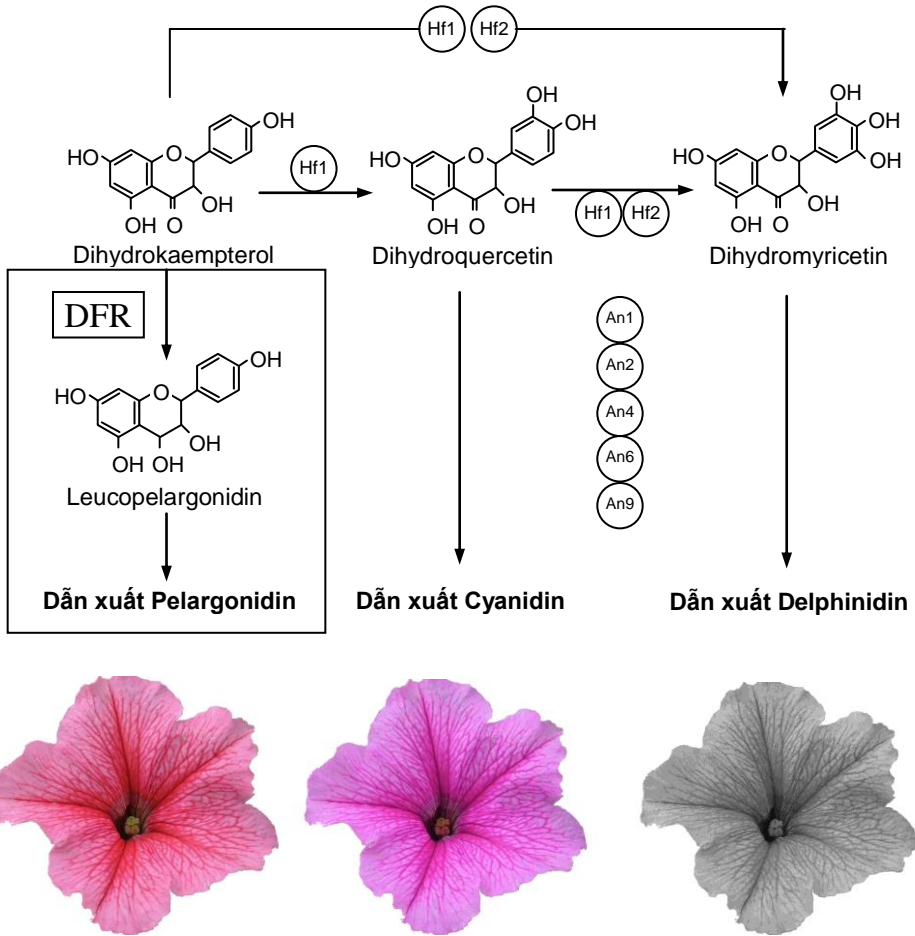
Cây hoa (màu)	Biến đổi gen	Đặc điểm mới
Cúc (màu hồng)	CHS	Hoa màu trắng
Đồng tiền (màu đỏ)	Antisense-CHS, DFR	Hoa màu hồng
Cẩm chướng (màu hồng)	CHS	Hoa màu đỏ nhạt
Cẩm chướng (màu trắng)	F3'5'H và DFR	Hoa màu xanh
Cẩm chướng (màu đỏ)	Antisense-F3H	Hoa màu trắng
Dã yên thảo (màu tím)	Antisense-CHS	Hoa màu trắng

Cây dã yên thảo biến đổi gen có màu đỏ hồng (cây bình thường không có màu này), được đưa ra từ Viện Max-Planck ở Koeln cho nghiên cứu lai tạo là do can thiệp vào sự tổng hợp flavonoid. Bình thường thì cây dã yên thảo tạo nên chất màu cyanidin (đỏ) và delphindin (xanh). Trong một đột biến có màu trắng, cây không tổng hợp được chất màu này, được tạo dòng gen mã hóa cho enzyme dihydroflavonol-4-reductase (DFR) có nguồn gốc từ ngô. Nhờ hoạt tính của enzyme DFR làm xuất hiện chất leucopelargonidin, đã mang lại cho cây biến đổi gen màu đặc trưng này.

Khi người ta đã chuyển gen mã hóa chalcone synthase (CHS), một enzyme chủ yếu trong quá trình tổng hợp các sắc tố anthocyanin, vào cây dã yên thảo thì thu nhận được những cây có hoa màu trắng hoặc đỏ. Nguyên nhân là do gen CHS sau khi được biến nạp đã gắn vào một vị trí bất kỳ trên bộ gen của cây sẽ gây ra hiện tượng “đồng loại bỏ” (co-suppression), ức chế sự biểu hiện của gen CHS nội bào dẫn đến sự hình thành các màu mới.

Việc sản xuất các cây hoa chuyển gen như hoa hồng, cẩm chướng, cúc và hoa tulip tương đối đơn giản. Công ty Florigen và Suntory đã phát triển hoa cẩm chướng chuyển gen (MoondustTM) màu xanh mà cho đến nay không thể tạo ra được bằng phương pháp lai tạo truyền thống. Thành công

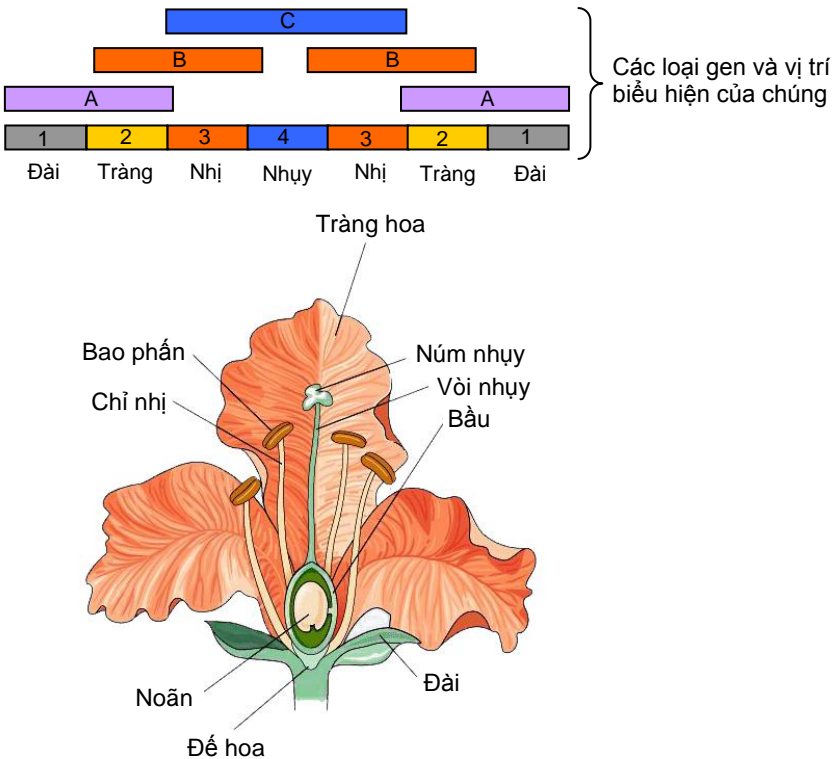
này là nhờ đưa những enzyme tương ứng từ cây dã yên thảo vào loại cẩm chướng hoa trắng (Bảng 2.2). Những loại cây này đã được đưa ra trồng ở các nước trong EU. Trong tương lai chắc chắn sẽ có nhiều cây hoa biến đổi gen với nhiều màu sắc hơn.



Hình 2.10. Sơ đồ biểu diễn hoạt tính của gen *Al* có nguồn gốc từ ngô trong cây dã yên thảo trắng. Nhờ sản phẩm gen *Al* là dihydroflavanol reductase (DFR) mà dihydrokaempferol được khử thành leucopelargonidin, chất này sau đó được biến đổi thành sắc tố pelargonidin màu hồng đỏ nhờ các enzyme trong cây.

2.5.2. Thay đổi hình dạng hoa

Đã từ lâu con người đã can thiệp vào tự nhiên để tạo ra cây hoa đẹp. Ngoài ra, dạng đột biến tự nhiên cũng tạo ra những giống mới. Một thời gian dài người ta không hiểu cơ sở di truyền của sự phát triển hoa. Từ những nghiên cứu cơ bản của các nhà khoa học Đức và Mỹ, một số gen tham gia vào quá trình này đã được xác định. Thí nghiệm được thực hiện trước hết ở hai loài *Antirrhinum majus* và *Arabidopsis thaliana* và đã xác định được mô hình ABC của sự phát triển hoa (Hình 2.11). Mô hình này cho biết, đài hoa, cánh hoa, nhị hoa và bầu nhụy tồn tại ở ba vùng chức năng trong cấu tạo hoa, được gọi là A, B và C. Mỗi vùng được xác định bởi một hoặc nhiều gen, được gọi là gen A, B và C. Đài hoa xuất hiện là do hoạt động của gen A, cánh hoa là kết quả đồng hoạt động của gen A và B, nhị hoa là do hoạt động của gen B và C và bầu nhụy là gen C.



Hình 2.11. Sự tạo thành các cơ quan xác định do sự biểu hiện của 3 lớp gen (A, B và C). Cấu tạo hoa từ ngoài vào trong: đài hoa, cánh hoa, nhị hoa

và nhụy hoa. Ở các tế bào chỉ có gen A biểu hiện thì xuất hiện đài hoa, gen A và B cùng biểu hiện thì xuất hiện cánh hoa, gen B và C cùng biểu hiện thì xuất hiện nhị hoa, chỉ có gen C biểu hiện thì xuất hiện nhụy hoa. Ở cây mà cả 3 loại gen đều bất hoạt được gọi là thể đột biến: tất cả các cơ quan giống như các lá nhỏ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cơ sở di truyền của cấu tạo hoa ở phần lớn cây có hạt là giống nhau. Người ta lợi dụng đặc điểm này đối với cây biến đổi gen để thay đổi hình dạng hoa. Ví dụ: khi làm ngừng hoạt động gen C thì hoa chỉ còn đài hoa và cánh hoa.

2.6. Bất dục đực nhân tạo để sản xuất hạt lai

Điều đã được khẳng định từ hàng trăm năm nay là, khi lai giữa hai loài thì thế hệ con lai (thế hệ F_1) thể hiện sự sinh trưởng tốt hơn và năng suất cao hơn, được gọi là ưu thế lai. Hạt giống thu được từ phép lai trên, trước hết là ở ngô và sau đó là ở các cây trồng khác. Tuy nhiên, phần lớn cây tự thụ phấn, nên việc lai khó thực hiện được. Ở ngô bông cờ được loại bỏ bằng tay nhằm tránh hiện tượng tự thụ phấn, nhưng phương pháp này không áp dụng được ở phần lớn các cây trồng khác. Cách giải quyết vấn đề này là sự phát hiện ra hiện tượng được gọi là bất dục tế bào chất (CMS), làm cho hạt phấn bất dục.

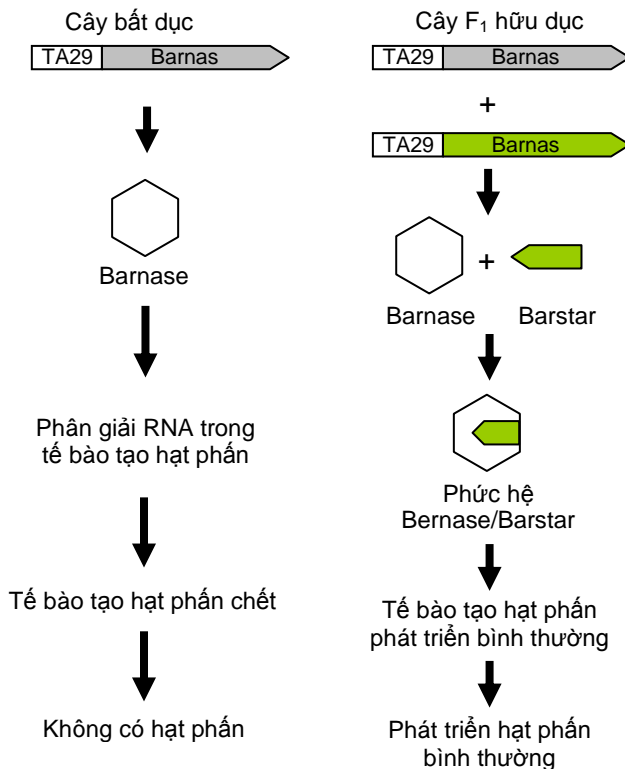
Tuy nhiên, không thể sử dụng cây bất dục đực trong mọi trường hợp, vì một số loài thực vật người ta chưa biết hệ thống CMS và một số hệ thống CMS không ổn định dưới những điều kiện thời tiết nhất định, do bị ảnh hưởng bởi những biến động về sinh lý. Những yếu tố này đã hạn chế việc sản xuất hạt lai.

Những công trình thử nghiệm đã chuyển một phức hợp gồm gen *rolC* của *A. tumefaciens* và promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus: virus gây bệnh khảm ở súp- lơ) vào cây thuốc lá đã tạo được cây chuyển gen bất thụ. Kết quả này đang được nghiên cứu và áp dụng trên nhiều loại cây khác.

Có nhiều hệ thống khác nhau được áp dụng để tạo ra cây biến đổi gen bất dục đực, ví dụ trường hợp sau:

Hệ thống đã được ứng dụng gọi là hệ thống Barnase-Bastar. Barnase là một RNase, được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*.

Enzyme này được vi khuẩn thải ra môi trường xung quanh và có khả năng phân giải RNA của các vi khuẩn cạnh tranh. Bên cạnh Barnase, *B. amyloliquefaciens* còn tạo ra protein Barstar, một chất ức chế đặc hiệu của Barnase. Nhờ vậy mà nó tự bảo vệ trước tác dụng của Barnase. Xu hướng tạo cây biến đổi gen bất dục đực được chỉ ra ở cây thuốc lá trong các nghiên cứu cơ bản. Ở đây gen Barnase được gắn với một promoter đặc hiệu tapetum (TA29, bảng 1.5) (Hình 2.12). Nhờ sự biểu hiện của Barnase trong các tế bào **tapetum** mà RNA của các tế bào này bị phân giải và tế bào **tapetum** chết. Hậu quả hạt phấn bị thoái hóa, thường thì hạt phấn được cung cấp từ các tế bào **tapetum**. Tương ứng là các thực vật này bất dục đực (Hình 2.12). Đối với các cây trồng cho mục đích thương mại, điều cần thiết là cây thế hệ sau của các cây bất dục đực là cây hữu dục, thì quả và hạt mới được tạo thành. Điều này đạt được do sự gắn promoter TA29 với gen Barstar. **Trong thế hệ sau của phép lai ở thực vật với sự biểu hiện đặc hiệu tapetum của Barnase và Barstar xuất hiện cây hữu dục, vì protein Barstar tạo một phức chất với Barnase và Barnase sau đó bất hoạt** (Hình 2.12).



Hình 2.12 Bất dục nhân tạo. Bên trái: Cây trong đó gen mã hóa cho Barnase được biến nạp dưới sự điều khiển của promoter đặc hiệu **tapetum**, là bất dục vì Barnase phân giải RNA trong tế bào tapetum, làm cho tế bào này chết. Hậu quả là hạt phấn không phát triển. Bên phải: Cây tạo hạt, vì một gen thứ hai (Barstar) được đưa vào bằng phương pháp lai tạo. Barnase kết hợp với Barstar thành một phức chất không phân giải được RNA. Do vậy hạt phấn phát triển bình thường.

Promoter đặc hiệu **tapetum** được điều khiển chính xác trong nhiều thực vật một và hai lá mầm và vì vậy hệ thống này được ứng dụng trong nhiều loại cây trồng như củ cải dầu, cà chua hoặc ngô.

Một kết quả khác là sử dụng N-acetyl-L-ornithinedeacetylase có nguồn gốc từ *E. coli*. Khi sử dụng promoter TA29 sự biểu hiện của gen này ở cây biến đổi gen bị giới hạn ở tế bào **tapetum**. Người ta phun N-acetyl-L-phosphinothricin vào thời điểm cây nở hoa, hợp chất này không độc và được biến đổi thành L-phosphinothricin, một glufosinate ở trong các tế bào **tapetum** đã làm chết các tế bào này.

Gen bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ cũng đã được chuyển vào lúa nhằm mục đích sản xuất hạt lúa lai. Hiện nay, trên thế giới có 6 gen bất dục đực nhạy cảm với nhiệt độ đã được lập bản đồ phân tử, gen *tms1* nằm trên nhiễm sắc thể 8 (Trung Quốc), gen *tms2* nằm trên nhiễm sắc thể 7 (Nhật), gen *tms3* nằm trên nhiễm sắc thể 6 (IRRI), gen *tms4* nằm trên nhiễm sắc thể 2 (Việt Nam), gen *tms5* (sa-2) nằm trên nhiễm sắc thể 9 (Ấn Độ), gen bất dục đực mới nhạy cảm với nhiệt độ của Việt Nam cũng được lập bản đồ phân tử nằm trên nhiễm sắc thể 4. Ở nước ta, bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn kết hợp với chỉ thị phân tử bước đầu thành công trong việc quy tụ gen tạo vật liệu bố mẹ phục vụ cho công tác tạo giống lúa lai.

Trong những năm qua, các nhà khoa học ở Việt nam cũng đã nghiên cứu chuyển gen vào một số cây trồng và thu được một số thành công bước đầu. Bằng phương pháp biến nạp qua *Agrobacterium* đã thu nhận được cây thuốc lá mang gen *nptII* và *gus*, cây đậu xanh mang gen *bar*, *gus* và gen kháng sâu *CryIA(c)*, hai giống lúa DT10 và DT13 kháng thuốc diệt cỏ, kháng bệnh khô vằn, lúa VL 902 kháng bệnh bạc lá, lúa kháng rầy chứa gen GNA, lúa chuyển gen tạo β -caroten, ngô và bông chứa gen *Bt*, đậu tương

AR-02, 3950, 5409 kháng thuốc diệt cỏ, khoai lang kháng sâu đục thân, bắp cải CB 26 kháng sâu tơ và hoa cúc tươi lâu.

Câu hỏi

1. Xu hướng phát triển của cây trồng chuyển gen?
2. Các thành tựu đạt được theo hướng tăng tính kháng sâu và bệnh cho cây trồng bằng phương pháp chuyển gen?
3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong việc nâng cao chất lượng nông sản phẩm trong sản xuất nông nghiệp?
4. Ứng dụng của thực vật chuyển gen trong sản xuất hoa và sản xuất hạt lai?

Chương 3

Công nghệ chuyển gen ở động vật

3.1. Công nghệ gen trong tạo giống vật nuôi mới

Mục đích của công tác chọn giống và nhân giống là cải thiện tiềm năng di truyền của vật nuôi nhằm nâng cao năng suất và hiệu quả chăn nuôi. Trong công tác nhân giống truyền thống, người ta sử dụng chủ yếu phương pháp lai tạo và chọn lọc để cải tạo nguồn gen động vật. Tuy nhiên, các động vật thu được qua lai tạo và chọn lọc còn mang cả các gen không mong muốn do tổ hợp hai bộ nhiễm sắc thể nguyên vẹn của tinh trùng con bố và tế bào trứng con mẹ. Một hạn chế nữa là việc lai tạo tự nhiên chỉ thực hiện được giữa các cá thể cùng loài. Lai xa, lai giữa các loài khác nhau, gặp nhiều khó khăn và thường bất thụ do sự sai khác bộ nhiễm sắc thể giữa bố và mẹ cả về số lượng lẫn hình thái; do cấu tạo cơ quan sinh dục không tương hợp; do chu kỳ sinh sản khác nhau, tinh trùng của loài này bị chết trong đường sinh dục của loài kia; do tập tính sinh học... Gần đây, nhờ những thành tựu trong công nghệ DNA tái tổ hợp, công nghệ gen động vật ra đời đã cho phép khắc phục những trở ngại trong công tác tạo giống truyền thống để tạo ra các động vật mang các tính trạng mong muốn trong một thời gian ngắn hơn và chính xác hơn.

Bằng các kỹ thuật tiên tiến của công nghệ sinh học hiện đại, Palmiter và cộng sự (1982) đã chuyển được gen hormone sinh trưởng của chuột cống vào chuột nhắt, và tạo ra được chuột nhắt “khổng lồ” (Hình 3.1). Từ đó đến nay hàng loạt động vật nuôi chuyển gen đã ra đời như: thỏ, lợn, cừu, dê, bò, gà, cá...

Công nghệ gen động vật là một quá trình phức tạp và ở những loài khác nhau có thể khác nhau ít nhiều nhưng phương thức cơ bản bao gồm các bước chính sau:

+ **Tách chiết, phân lập gen và tạo tổ hợp biểu hiện trong tế bào động vật**

Người ta có thể phân lập được gen mong muốn từ sản phẩm biểu hiện của nó như mRNA hoặc protein.



Hình 3.1. Chuột nhắt chuyển gen hormone sinh trưởng có kích thước lớn hơn nhiều lần so với chuột nhắt bình thường.

Từ mRNA dưới tác dụng của enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) tổng hợp ra DNA bổ sung mạch đơn (single strand complementary DNA, ss cDNA), tiếp theo là cDNA mạch kép (ds cDNA). cDNA khác với DNA gốc là không chứa các đoạn intron mà chỉ bao gồm các exon. Sự sai khác này gây ảnh hưởng tới hoạt động của gen bổ trợ trong hệ thống tế bào động vật.

Từ sản phẩm protein, có thể suy ra trình tự nucleotide của gen cấu trúc trên cơ sở trình tự các amino acid trong phân tử protein. Điều này cho phép tạo ra đoạn mồi (primer) để dò tìm đoạn gen mong muốn.

Gen cấu trúc muốn hoạt động để biểu hiện ra protein mà nó quy định trong hệ thống tế bào nhất định thì phải có promoter thích hợp với hệ thống mà nó hoạt động. Promoter ở tế bào động vật có nguồn gốc hoặc từ động vật như methallothionein (mt), thymidine kinase (tk) hoặc từ virus động vật như simian virus (SV40), rous sarcoma virus (RSV)...

+ Tạo cơ sở vật liệu biến nạp gen

Ở động vật có vú, giai đoạn biến nạp gen thích hợp nhất là trứng ở thời kỳ tiền nhân (pronucleus), lúc mà nhân của tinh trùng và trứng chưa dung hợp (fusion) với nhau. Ở giai đoạn này tổ hợp gen lạ có cơ hội xâm nhập vào genome của động vật nhờ sự tái tổ hợp DNA của tinh trùng và của trứng. Do tế bào phôi chưa phân chia và phân hóa nên tổ hợp gen lạ được biến nạp vào giai đoạn này sẽ có mặt ở tất cả các tế bào kể cả tế bào sinh sản của động vật trưởng thành sau này.

Trường hợp động vật có vú, trứng chín được thu nhận bằng phương pháp sử dụng kích dục tố theo chương trình đã được xây dựng cho mỗi loài

hoặc bằng phương pháp nuôi cấy trứng trong ống nghiệm (*in vitro*). Sau đó thụ tinh nhân tạo để tạo ra trứng tiền nhân.

Trường hợp cá, biến nạp gen thích hợp nhất là ở giai đoạn phôi có từ 1-4 tế bào. Phôi này được tạo ra bằng cách thu nhận trứng và tinh dịch nhờ phương pháp sử dụng kích dục tố (kích thích tố sinh dục trong nhau thai của người-HCG, não thùy thể cá chép) rồi thụ tinh nhân tạo.

+ Chuyển gen vào động vật

Có nhiều phương pháp khác nhau để chuyển gen vào động vật như: phương pháp vi tiêm (microinjection), sử dụng tế bào mầm phôi (embryonic stem cell-ESC), phương pháp xung điện (electroporation), sử dụng vector virus...

+ Nuôi cấy phôi trong ống nghiệm (đối với động vật bậc cao)

Tế bào trứng tiền nhân sau khi vi tiêm được nuôi cấy *in vitro* để phát triển đến giai đoạn phôi dâu (morula) hoặc phôi nang (blastocyst). Ở giai đoạn này màng trong (pellucida) bị bong ra và phôi có thể làm tổ được ở dạ con. Cây chuyển những phôi này vào con nhận đã được gây chửa giả (pseudopregnant) để phát triển thành cá thể con.

Đối với động vật bậc thấp như cá không cần giai đoạn này. Tuy nhiên, ở cá người ta phải tiến hành loại màng thứ cấp (chorion), kéo dài giai đoạn phôi 1-4 tế bào và áp nhân tạo phôi trần để tạo cá bột.

+ Kiểm tra động vật được tạo ra từ phôi chuyển gen

Để khẳng định động vật có được chuyển gen lạ vào hay không người ta phải kiểm tra xem gen lạ có xâm nhập được vào bộ máy di truyền của động vật trưởng thành hay không và sản phẩm của gen lạ có được tổng hợp ra hay không.

Trường hợp thứ nhất, người ta sử dụng phương pháp lai phân tử trên pha rắn (phương pháp Southern blot hoặc dot (slot) blot) hoặc PCR.

Trường hợp thứ hai, phải khẳng định được gen lạ có hoạt động hay không. Để phát hiện protein do gen lạ tổng hợp người ta sử dụng phương

pháp Western blot hay kỹ thuật ELISA hoặc kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA).

+ Theo dõi thế hệ sau của động vật chuyển gen để xác định gen lạ có di truyền hay không

Hiện nay, việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen trong việc tạo giống vật nuôi mới đang tập trung vào các hướng cơ bản được trình bày dưới đây.

3.1.1. Tạo giống vật nuôi có tốc độ lớn nhanh, hiệu quả sử dụng thức ăn cao

Trong hướng này, người ta tập trung chủ yếu vào việc đưa tổ hợp gen cấu trúc của hormone sinh trưởng và promoter methallothionein vào gia súc. Cho đến nay, người ta đã đưa thành công gen này vào thỏ, lợn và cừu. Kết quả là những động vật chuyển gen này không to lên như ở chuột. Ở Đức, trong trường hợp ở lợn chuyển gen hormone sinh trưởng lượng mỡ giảm đi đáng kể (từ 28,55 mm xuống còn 0,7 mm) và hiệu quả sử dụng thức ăn cao hơn. Ở Australia, lợn chuyển gen hormone sinh trưởng có tốc độ lớn nhanh hơn đối chứng là 17%, hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn 30%. Tuy nhiên, động vật nuôi chuyển gen hormone sinh trưởng có biểu hiện bệnh lý lớn quá cỡ và chưa có ý nghĩa lớn trong thực tiễn. Các nhà khoa học ở Granada (Houston, Mỹ) đã tạo ra được bò chuyển gen tiếp nhận estrogen người (human estrogen receptor) có tốc độ lớn nhanh. Họ đã thành công trong việc đưa gen hormone sinh trưởng giống insulin bò (bovine insulin like growth hormone) vào gia súc để tạo ra giống gia súc thịt không dính mỡ. Để tạo ra động vật chuyển gen thật sự có ý nghĩa trong thực tiễn cho chăn nuôi cần phải tìm được gen khởi động (promoter) thích hợp. Gần đây, Sutrave (1990) đã khám phá ra gen *Ski*, mà dưới tác động của gen này protein cơ được tổng hợp rất mạnh, trong khi đó lượng mỡ lại giảm đi đáng kể. Phát hiện này mở ra triển vọng tạo ra giống lợn nhiều nạc, ít mỡ, hiệu suất sử dụng thức ăn cao. Để tăng biểu hiện của hormone sinh trưởng nhằm tăng sản lượng, người ta đã thành công trong việc tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng. Cá chuyển gen hormone sinh trưởng người lớn nhanh gấp hai lần so với cá đối chứng không chuyển gen (Zhu, 1985). Các nhà khoa học Canada đã chuyển gen hormone sinh trưởng tái tổ hợp vào phôi cá hồi đang phát triển tạo ra được cá hồi chuyển gen đầu tiên. Cá hồi chuyển gen này không những

có chu kỳ sinh sản ngắn mà còn có trọng lượng lớn gấp 11 lần so với cá hồi không chuyển gen (Hình 3.2).



Hình 3.2. Cá hồi chuyển gen hormone sinh trưởng có trọng lượng lớn gấp 11 lần so với đối chứng.

Ở Việt nam, Nguyễn Văn Cường và cộng sự đã và đang nghiên cứu chuyển gen hormone sinh trưởng người vào chuột, cá vàng (*Carassius auratus*), cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) và cá chép (*Cyprinus carpio*). Với một số kết quả đã đạt được, việc nghiên cứu tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng đang được tiếp tục tiến hành.

3.1.2. Tạo giống vật nuôi chuyên sản xuất protein quý dùng trong y dược

Đây là hướng có nhiều triển vọng nhất bởi vì nhiều protein dược phẩm quý không thể sản xuất qua con đường vi sinh hoặc sinh vật bậc thấp, do những sinh vật này không có hệ enzyme để tạo ra những protein có cấu tạo phức tạp.

Ý định sử dụng tuyến sữa của động vật bậc cao để sản xuất ra protein quý lần đầu tiên được Clark (1987) đề xuất. Nội dung của kỹ thuật này là gắn gen cấu trúc với β -lactoglobulin (là promoter điều khiển sự biểu hiện

của gen ở tuyến sữa). Khi đưa tổ hợp có chứa promoter β -lactoglobulin vào cừu và chuột thì ông đã thấy chúng biểu hiện rất cao ở tuyến sữa (Hình 3.3).



Hình 3.3. Sơ đồ quy trình sản xuất protein thông qua tuyến sữa.

Cho đến nay, rất nhiều protein dược phẩm quý đã và đang được nghiên cứu để sản xuất qua tuyến sữa của động vật như:

- α_1 -antitripsin và yếu tố làm đông máu IX (blood clotting factor IX) của người đã được tiết ra trong sữa cừu với nồng độ 25 mg/ml.

- Hoạt tố plasminogen mô của người (human tissue plasminogen activator) làm tăng đông máu đã được tiết ra ở sữa dê.

- Gen urokinase người đã được đưa thành công vào lợn và tiết ra ở tuyến sữa nhờ gen khởi động α -casein của bò.

- Protein C người được tạo ra từ sữa lợn chuyển gen...

GenPharm, một công ty Công nghệ sinh học của California, đã tạo ra một bò đực chuyển gen lactoferrin người (human lactoferrin-HLF) có tên là Herman (Hình 3.4). HLF có chức năng kháng khuẩn và vận chuyển sắt ở người. Hiện nay, nhiều bò cái thế hệ con của Herman đã sản xuất ra sữa chứa HLF và GenPharm có ý định phát triển đàn bò chuyển gen này để sản xuất HLF thương mại với qui mô lớn.



Hình 3.4. Bò đực Herman chuyển gen HLF.

Mặt khác, các protein dược phẩm mong muốn cũng được tạo ra trong dịch cơ thể không thuộc mô vú như máu. Cho đến nay, phương pháp này chỉ mới được sử dụng để biểu hiện hemoglobin người với mức cao ở lợn chuyển gen (Sharma 1994).

Hiện tại, đã có hai protein được sản xuất bằng con đường này là α_1 -antitripsin người và hoạt tố plasminogen mô của người. Chất đầu được sản xuất qua sữa cừu với nồng độ 35 g/l, còn chất sau sản xuất qua sữa dê. Hãng

Genetech (Mỹ) hàng năm thu được 196,4 triệu USD từ sản phẩm hoạt tố plasminogen mô với giá 2,2 USD/liều. Hormone sinh trưởng người cũng là sản phẩm của kỹ thuật gen do vi sinh vật tổng hợp với mức thu hàng năm 122,7 triệu USD. Hiện tại, các nhà khoa học Mỹ muốn giảm giá thành của sản phẩm này bằng cách sản xuất qua sữa thỏ. Người ta dự đoán giá thành sản xuất hormone này qua sữa thỏ chỉ bằng 1/3 giá thành hiện tại sản xuất nhờ vi sinh vật. Lý do là chu kỳ sinh sản của thỏ ngắn và lượng protein sữa của thỏ lại cao. Trong một năm lượng protein sữa của sáu con thỏ bằng của một con bò.

Tập đoàn Genzyme Transgenic (Mỹ) đã sản xuất ra nhiều loại protein quý từ sữa của chuột và dê chuyển gen (Bảng 3.1).

Bên cạnh hai phương pháp trên, các nhà khoa học đã phát triển động vật chuyển gen sản xuất ra dược phẩm ở trong bàng quang của chúng. Khả năng sử dụng nước tiểu của động vật để sản xuất protein tăng lên vào năm 1995, khi Sung và cộng sự (Đại học New York) chứng minh rằng có những gen chỉ hoạt động ở bàng quang. Các gen này mã hóa cho protein uroplakins. Protein này là một thành phần tham gia hình thành nên màng bàng quang. Kerr (1998) đã nghiên cứu tạo ra chuột chuyển gen sản xuất hormone sinh trưởng người từ nước tiểu. Gen hormone sinh trưởng người được nối với promoter uroplakin. Promoter này kiểm soát vị trí và thời gian hoạt động của gen. Chuột mang gen ngoại lai đã tạo ra 500 ng hormone sinh trưởng người trong 1 ml nước tiểu thải ra. Mặc dù sản phẩm của chuột chuyển gen chỉ là một lượng nhỏ nhưng chúng cho thấy rằng trong tương lai nước tiểu của vật nuôi có thể sẽ được lựa chọn. Nước tiểu có những ưu thế vượt trội so với sữa. Cả động vật đực và cái đều bài tiết nước tiểu, được bắt đầu ngay sau khi sinh ra. Nước tiểu của các đại gia súc chứa nhiều protein hơn ở trong sữa của chúng. Mặt khác, trên thực tế chi phí cho việc tinh chế thuốc từ nước tiểu thấp hơn so với sữa. Một vài protein có thể không thích hợp đối với việc khai thác từ sữa bởi vì chúng làm tổn thương mô vú.

Bảng 3.1. Mức độ biểu hiện của một số protein trong sữa động vật chuyển gen.

Loại protein	Chuột (g/l)	Dê (g/l)
AAT	35	20
Longer acting tPA	6	6
AT III	10	10
BR 96 Mab	4	14
Single chain antibody	1	
α -Human transferring receptor	2	
Soluble receptor CD4	8	
AT III Syn	1	
Antibody fusion protein	1	
β -IFN	0,2	
Mab	1	
Chitotriosidae	2	
Galactosyl transferase	1	
Sialyl transferase	0,1	
GAD	8	
Human growth hormone	4	
Proinsulin	8-14	
Myelin basic protein	4	
Single chain antibody fusion protein	0,2	
Prolactin	4	
Soluble HMW receptor	0,2	
CFTR membrane protein	0,001	
Factor Xa	0,3	
Urokinase	1	
Human transferrin receptor MAb	1	

3.1.3. Tạo giống vật nuôi kháng bệnh và sự thay đổi của điều kiện môi trường

Đến nay, người ta đã biết được một số gen có khả năng kháng bệnh của vật nuôi. Tiêm gen *Mx* vào lợn để tạo ra được giống lợn miễn dịch với bệnh cúm. Người ta, cũng đã thành công trong việc tiêm gen *IgA* vào lợn,

cừ, mở ra khả năng tạo được các giống vật nuôi miễn dịch được với nhiều bệnh...

Trong tự nhiên, cá sống trong nước lạnh ở hai cực quả đất, ở biên nhiệt đới ẩm áp và những vùng nước ôn hòa. Ở những nơi này điều kiện nhiệt độ thay đổi theo ngày cũng như thay đổi theo mùa. Trải qua quá trình tiến hóa lâu dài, cá đã có các cơ chế sinh lý thích nghi với những điều kiện nhiệt độ thay đổi này. Cũng như nhiều loài động vật khác, cá sử dụng gen sốc nhiệt để phản ứng với điều kiện nhiệt độ tăng cao, nhưng trong điều kiện quá lạnh một vài loài cá đã tiến hóa theo hướng gen chống lạnh. Gen này mã hóa protein giữ cho máu khỏi đông. De Vries đã phát hiện ra protein chống lạnh này (antifreeze protein, AFP). Theo De Vries, trường hợp các loài cá ở vùng Bắc cực và Nam cực thì gen AFP biểu hiện suốt cả năm, trong khi các loài cá sống ở vùng nước ôn hòa gen AFP chỉ biểu hiện trong mùa đông. Các protein AFP cho phép cá sống được trong điều kiện nhiệt độ thấp. Hew (1988) đã vi tiêm gen AFP của cá bơm mùa đông vào cá hồi, tạo ra các con cá hồi chuyển gen có khả năng chịu được điều kiện lạnh với mục đích mở rộng khả năng sống sót của cá hồi vào mùa đông trong các bể nuôi cá nước mặn. Đây là một thuận lợi lớn cho việc nuôi trồng nguồn thủy sản quan trọng này.

3.1.4. Tạo giống vật nuôi có năng suất và chất lượng cao bằng cách thay đổi các con đường chuyển hóa trong cơ thể động vật

Trong hướng này nổi bật là những nghiên cứu nâng cao chất lượng sữa bò, sữa cừu bằng cách chuyển gen lactose vào các đối tượng quan tâm. Sự biểu hiện của gen này được điều khiển bởi promoter của tuyến sữa. Trong sữa của những động vật chuyển gen này, đường lactose bị thủy phân thành đường galactose và đường glucose. Do vậy, những người không quen uống sữa cũng có thể sử dụng được sữa này mà không cần quá trình lên men.

Hiện tại, người ta chú ý tới việc đưa một số gen của vi sinh vật vào cơ thể động vật. Tiến bộ nổi bật nhất trong hướng này là đưa gen mã hóa enzyme chịu trách nhiệm tổng hợp cysteine vào cừu. Cysteine là amino acid được tổng hợp từ serine nhờ hai enzyme là serine transacetylase và O-acetylserine sulfahydrylase. Hai gen chịu trách nhiệm tổng hợp hai enzyme này là *Cys E* và *Cys K*. Cysteine là amino acid cơ bản rất quan trọng trong

sự phát triển của lông. Những cố gắng để bổ sung amino acid này vào thức ăn đều không đạt kết quả do chúng bị phân hủy trong ống tiêu hóa của động vật. Bởi vậy, nếu đưa được gen tổng hợp cysteine vào cơ thể động vật sẽ làm tăng năng suất lông lên rất nhiều.

Tương tự, việc đưa gen tổng hợp amino acid cơ bản như threonine và lysine có nguồn gốc vi sinh vật vào cơ thể động vật để làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn của vật nuôi là có triển vọng trong tầm tay.

3.2. Công nghệ sinh sản

3.2.1. Siêu bài noãn

Sự thành thực và thụ tinh nhân tạo của trứng đã tăng lên nhờ kỹ thuật siêu bài noãn, cung cấp một phương tiện khắc phục vấn đề sinh sản ít hiệu quả của vật nuôi. Thông thường, một buồng trứng bò chứa khoảng 50.000 trứng chưa thành thực. Tuy nhiên, trung bình chỉ 3-4 trong số trứng này sẽ có kết quả trong việc sinh sản ra các bê con trong suốt thời gian sống của một bò mẹ. Sử dụng các kỹ thuật siêu bài noãn hiện nay, từ một con bò đã xử lý, cho phép một lần có thể thu nhận được 10 trứng và một nửa số trứng này phát triển thành phôi. Kỹ thuật siêu bài noãn cải tiến giúp tăng số lượng trứng thích hợp cho thụ tinh nhân tạo. Như thế số con sinh ra từ một động vật có thể là rất nhiều.

Các loại hormone như FSH, PMSG, HMG, pergonal... thường được sử dụng để gây siêu bài noãn. Các hormone này có thể được dùng riêng rẽ hay phối hợp với HCG hay PGF 2α . Thời gian thích hợp để gây siêu bài noãn thường nằm trong pha thể vàng của chu kỳ động dục.

Ở cá người ta thường sử dụng não thùy thể cá chép hoặc HCG để kích thích sinh sản nhân tạo.

3.2.2. Thụ tinh nhân tạo

Thụ tinh nhân tạo (artificial insemination) là kỹ thuật sinh sản có nhiều lợi ích, được sử dụng rộng rãi và ra đời sớm nhất trong tất cả các kỹ thuật sinh sản mới. Thụ tinh nhân tạo hãy đang còn phát triển và ngày càng được cải tiến.

Thụ tinh nhân tạo là một kỹ thuật sinh sản bao gồm việc lấy tinh dịch ra ngoài con đực, đánh giá chất lượng tinh dịch (kể cả pha loãng và bảo tồn)

rồi đưa tinh dịch ấy vào đường sinh dục của con cái để đảm bảo thu được thế hệ sau.

Kỹ thuật thụ tinh nhân tạo bao gồm các bước cơ bản sau:

- Lấy tinh. Thường sử dụng phương pháp âm đạo giả vì nó có nhiều ưu điểm như cho phép thu được tinh dịch thuần khiết, các phản xạ phóng tinh của con đực xảy ra bình thường, cấu tạo của âm đạo giả đơn giản, gần với tự nhiên và đặc biệt là dễ sử dụng.

- Đánh giá chất lượng tinh trùng và pha loãng tinh dịch.

- Bảo quản tinh dịch. Có hai hình thức là ngắn hạn (tinh lỏng) và dài hạn (tinh đông lạnh).

- Phát hiện động dục ở con cái.

- Dẫn tinh cho con cái.

Thụ tinh nhân tạo cho phép một con đực giống có thể phối giống với nhiều con cái hơn so với khả năng thông thường và cho phép tiến hành đồng thời ở nhiều cơ sở nhân giống cũng như đánh giá chính xác giá trị gây giống của con đực. Mặt khác vì số lượng cá thể con ở đời sau lớn nên có thể nên có thể áp dụng chọn lọc chặt chẽ và có thể đưa nhanh đàn đã cải tiến vào phần còn lại của quần thể. Thụ tinh nhân tạo còn có thể khắc phục được tính không tương hợp về thể trọng, về sinh lý hay tập tính giữa các giống hay các loài thân thuộc. Kết hợp với việc chọn lọc tăng cường và kiểm tra hậu thế, thụ tinh nhân tạo đã mang lại hiệu quả lớn trong sản xuất sữa (Vishwanath 2003, Hansen and Block 2004) và việc kết hợp với giới tính của tinh trùng (tách tinh trùng mang nhiễm sắc thể X và tinh trùng mang nhiễm sắc thể Y, Seidel 2003) đang bắt đầu mở rộng lợi ích của nó xa hơn nữa. Ở gia súc nói chung và bò nói riêng có quá nhiều bệnh do giao cấu, thụ tinh nhân tạo tránh được các bệnh truyền qua con đường này.

+ Thụ tinh nhân tạo ở bò

Trong khoảng thập niên từ 1940-1950, thụ tinh nhân tạo ở bò sữa hầu như chỉ sử dụng tinh lỏng do vậy các nhà chăn nuôi ít có cơ hội để lựa chọn con đực giống. Đến đầu thập niên 1960, tinh đông lạnh trở nên phổ biến và cho phép sử dụng rộng rãi hơn các con đực giống xuất sắc, có thể ngay sau khi chúng đã chết và cho phép các nhà chăn nuôi tự do lựa chọn.

Đối với bò thịt, việc sử dụng thụ tinh nhân tạo ít hơn ở bò sữa. Sở dĩ như vậy là do việc quản lý bò thịt với qui mô rộng lớn hơn đã làm cho việc phát hiện động dục chính xác và sau đó là xử lý bò cái để thụ tinh nhân tạo là khó hơn..

+ Thụ tinh nhân tạo ở lợn

Nhìn chung, ở hầu hết các nước, thụ tinh nhân tạo ở lợn bị hạn chế nhiều. Điều này do những khó khăn về mặt kỹ thuật cũng như nhu cầu thấp đối với dịch vụ này trong sản xuất. Khi tiến hành thụ tinh nhân tạo, tinh dịch lợn sử dụng phải tươi hoặc 72 giờ sau khi lấy tinh thì mới đạt được hiệu quả tốt (Mare 1984). Tuy nhiên ở một số nước, chi phí cho phối giống nhân tạo là tương đối thấp hơn so với phối giống tự nhiên nên nó cũng được sử dụng rộng rãi trong sản xuất.

+ Thụ tinh nhân tạo ở gia cầm

Đối với gia cầm thì việc lấy tinh dịch là dễ và gia cầm mái có thể được thụ tinh một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, chi phí thụ tinh nhân tạo cho một đơn vị sản phẩm là tương đối cao do gia cầm có kích thước nhỏ. Bởi vì tinh đông lạnh cho tỷ lệ thụ thai thấp nên trong thụ tinh nhân tạo ở gia cầm hầu như chỉ sử dụng tinh lỏng, mặc dù các phương pháp đông lạnh đã được cải tiến hiện nay đã cho tỷ lệ thụ thai cao đối với loại tinh này.

+ Thụ tinh nhân tạo ở cá

Đối với cá, khi thụ tinh nhân tạo tốt nhất là lấy trứng và tinh dịch cùng một lúc, nhất là khi nhiệt độ cao. Thụ tinh như vậy sẽ nhanh và có hiệu quả cao.

Khi lấy tinh dịch, một người đặt cá đực vào khăn ướt đã vắt kiệt nước, bụng hướng lên trên, giữ cho cá khỏi giãy, một người khác tay phải cầm pipetman, tay trái ấn nhẹ vào phần giữa và dưới vùng bụng sẹ, vuốt về phía sau, bỏ đi những giọt tinh dịch đầu tiên, rồi đưa pipetman vào gần lỗ sinh dục để hút lấy tinh dịch. Tinh dịch của mỗi con cá đực nên lấy hết trong một lần. Tương tự khi lấy trứng, dùng tay vuốt nhẹ phần bụng của cá cái trứng sẽ chảy ra ngoài.

Như chúng ta đã biết trứng thành thực ra khỏi buồng trứng không cùng một lúc mà theo từng đợt cho nên thời gian thụ tinh có hiệu quả của mỗi loạt trứng không đồng đều với nhau, mà việc lấy trứng thường chỉ làm một lần, do đó quá trình thụ tinh cần phải cố gắng hoàn thành nhanh chóng. Hiện nay, phương pháp thụ tinh nhân tạo thông thường là phương pháp thụ tinh khô. Có bốn cách thao tác như sau:

Cách thứ nhất. Sau khi lấy trứng, tùy theo số lượng trứng, cho nguyên tinh dịch đã lấy sẵn vào cốc nhỏ có nước muối sinh lý (lượng nước muối sinh lý gấp 10 lần tinh dịch) lắc đều, rồi tưới đều lên trứng.

Cách thứ hai. Để rút ngắn thời gian thụ tinh trước khi lấy trứng, đồ tinh dịch đã hòa với nước muối sinh lý vào khay thụ tinh sau đó lấy trứng cho vào, lắc nhẹ khay thụ tinh làm cho trứng và tinh trùng sớm tiếp xúc với nhau.

Hai cách trên đều là lấy tinh dịch trước, lấy trứng sau, có ưu điểm là có thể giảm bớt số người làm và chuẩn bị được đầy đủ số lượng tinh dịch cần thiết ngay từ đầu, nhưng khuyết điểm là thời gian thụ tinh hơi dài, vào mùa hè nhiệt độ cao thì không thích hợp lắm.

Cách thứ ba. Vừa lấy trứng vừa lấy tinh dịch. Trong khi lấy trứng thì đồng thời có một số người khác lấy tinh dịch và tưới nhanh vào trứng. Làm như vậy có thể rút ngắn thời gian thụ tinh đến mức độ tối đa nhưng nhược điểm là cần tăng thêm số người làm.

Cách thứ tư. Lấy trứng trước lấy tinh dịch sau. Sau khi lấy trứng, trực tiếp vuốt ngay tinh dịch của cá đực vào trứng. Phương pháp này có thể giảm bớt thời gian lấy tinh dịch.

Bất kỳ áp dụng phương pháp nào, sau khi đã trộn lẫn tinh dịch với trứng cũng cần dùng lông gà sạch khuấy nhẹ để thúc đẩy quá trình thụ tinh. Thời gian khuấy khoảng chừng 30-60 giây. Sau đó, từ từ cho nước sạch vào, vừa cho nước vừa khuấy chừng 30 giây, rồi để yên 30 giây. Sau cùng tiếp tục cho thêm nước sạch vào để rửa trứng, loại bỏ đi những tinh dịch, máu hoặc noãn dịch thừa. Rửa 2-3 lần thì cho trứng vào đĩa petri để tiến hành bóc màng, tạo phôi trần một tế bào chuẩn bị cho phương pháp vi tiêm gen ngoại lai vào.

Khi cho tinh dịch vào trứng, nếu thấy tinh dịch không tốt lắm, có thể dùng cách thụ tinh hỗn hợp, nghĩa là dùng tinh dịch của hai hoặc nhiều con đực. Trong trường hợp nhiều trứng nhưng tinh dịch không đủ có thể lấy tinh

sào của cá đực cắt thành nhiều miếng nhỏ, dùng nước muối sinh lý rửa để lấy tinh trùng. Sau đó dùng vải xô lọc rồi sử dụng.

3.2.3. Cây chuyển phôi và các công nghệ liên quan

+ **Thu nhận phôi**

Phương pháp phẫu thuật và không phẫu thuật là hai phương pháp được sử dụng để thu nhận phôi ở các gia súc. Thu nhận phôi bằng phương pháp phẫu thuật là phương pháp thu nhận phôi sau khi đã mổ con vật. Cũng có thể giết chết con vật, cắt lấy bộ phận sinh dục bên trong mang về phòng thí nghiệm để dùi rửa lấy phôi. Phương pháp không phẫu thuật đã được phát triển cho bò và ngựa cái đã cho kết quả như phương pháp phẫu thuật. Hiện nay, đây là phương pháp phổ biến được sử dụng để thu nhận phôi ở gia súc. Chúng bao gồm việc sử dụng một ống thông Foley cỡ 18-24 (gồm hai ống lồng vào nhau), cho phép dẫn dung dịch vào tử cung và sau đó cho phép dung dịch từ tử cung quay trở ra vào một vật chứa để chọn lọc. Một quả bóng nhỏ ở gần cuối ống thông có thể được thổi phồng ở phía bên trong sừng tử cung để ngăn cản không cho dịch tràn ra ngoài cổ tử cung. Dung dịch dùi rửa thu được để lắng khoảng 20-30 phút, gạn bỏ phần bên trên. Phôi được tách ra, đưa vào đĩa petri và được đánh giá ở độ phóng đại 75X. Phôi sống được phân loại và sắp xếp dựa vào sự biểu hiện hình thái của chúng. Phôi sau khi đánh giá phân loại có thể đem chuyển luôn cho vật nhận đồng pha (synchronized recipients) hoặc đem đông lạnh để sử dụng sau. Tất cả các phôi sống được cho vào môi trường giữ đã khử trùng (DPBS bổ sung với 0,4% BSA) theo sự chỉ dẫn của Hiệp hội chuyển phôi Quốc tế.

+ **Bảo quản phôi**

Đây là công đoạn được tiến hành trước khi cấy truyền phôi vào vật nhận, tạo điều kiện thuận lợi cho việc vận chuyển phôi đi xa. Phôi được bảo quản trong nitrogen lỏng (-196°C) đối với tất cả các vật nuôi, trừ lợn.

+ **Nuôi phôi**

Phôi được nuôi cấy tạm thời trong các hệ thống sống khác nhau như ống dẫn trứng của cừu chuột, thỏ; tử cung của bò; xoang phúc mạc của

chuột; xoang ối của phôi gà. Trong đa số các trường hợp, phôi được bọc bằng agar để bảo vệ cho màng trong suốt của phôi không bị tổn thương.

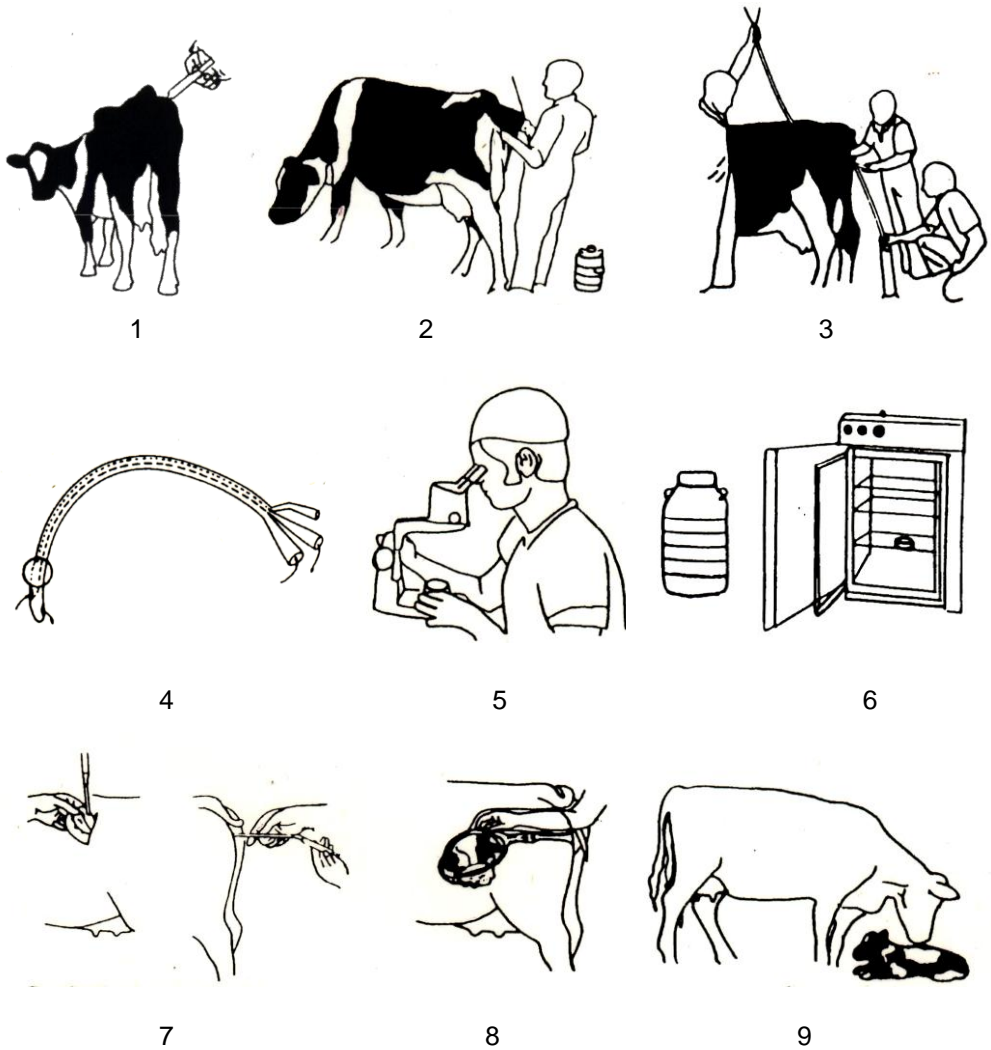
+ **Cấy chuyển phôi**

Cấy chuyển phôi (embryo transfer) là quá trình thu nhận phôi từ một con cái (con cho) và chuyển sang một con cái khác (con nhận) để hoàn thành thời kỳ có thai.

Nguyên tắc của việc cấy chuyển phôi là phôi được lấy ra ở vị trí nào thì cấy trả vào đúng vị trí đó nhờ súng chuyển phôi.

Phương pháp cấy chuyển phôi được sử dụng để tăng khả năng sinh sản của động vật cái. Hiện nay, đây là phương pháp phổ biến được sử dụng trong thực tiễn chọn giống gia súc ở nhiều nước trên thế giới. Các phương pháp cấy chuyển phôi khác nhau đã được phát triển. Hiệu quả của việc chuyển phôi phụ thuộc vào nhiều yếu tố nhưng quan trọng nhất là kinh nghiệm và kỹ năng của người thực hiện thao tác cấy chuyển phôi. Có hai phương pháp cấy chuyển phôi: phương pháp phẫu thuật và phương pháp không phẫu thuật. Phương pháp cấy chuyển phôi không phẫu thuật có một số ưu điểm: ít tổn kém, có thể đạt tỷ lệ thụ thai cao như phương pháp phẫu thuật. Vì vậy phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi (Hình 3.5).

Cấy chuyển phôi không phẫu thuật được thực hiện bằng cách sử dụng một súng chuyển phôi thu nhỏ xuyên qua cổ vào sừng tử cung. Các con nhận cùng lúc được kiểm tra sự có mặt của một thể vàng hoạt động (CL-corpora luteum). Việc gây tê màng cứng (epidural anesthesia) là để giảm đến mức tối thiểu sức căng. Phôi để cấy chuyển được hút vào một “cọng rơm” 0,25 ml ở trong một cột trung tâm chứa 20 ml môi trường giữ (holding medium) nằm ở giữa hai túi khí. “Cọng rơm” được lắp vào súng cấy chuyển phôi và một màng bọc với đầu kim loại được lắp qua đỉnh. Sau đó, một màng bọc vệ sinh được quấn trên đỉnh để tránh bất kỳ sự nhiễm trùng nào từ hệ vi khuẩn âm đạo. Bây giờ, súng chuyển phôi được đưa xuyên qua âm đạo đến ngoài miệng tử cung. Rồi sau đó màng bọc vệ sinh được xuyên qua và súng chuyển phôi được đưa từ từ qua cổ và thân tử cung đến trên 1/3 sừng tử cung, cùng phía với buồng trứng mang thể vàng. Piston của súng được đẩy chậm chậm để đặt phôi vào sừng tử cung và súng được rút ra từ từ.



Hình 3.5. Tóm tắt phương pháp chuyển phôi ở bò. 1: Gây siêu rụng trứng bò cho bằng gonadotropin. 2: Thụ tinh nhân tạo (5 ngày sau khi bắt đầu gây siêu rụng trứng). 3: Thu nhận phôi bằng phương pháp không phẫu thuật (6-8 ngày sau thụ tinh nhân tạo). 4: Ống Foley để thu nhận phôi. 5: Tách và phân loại phôi. 6: Bảo quản phôi không hạn định trong nitrogen lỏng ở 37 °C hoặc ở nhiệt độ phòng một ngày. 7: Chuyển phôi vào con nhận bằng phương pháp phẫu thuật hoặc không phẫu thuật. 8: Chẩn đoán thai bằng sờ nắn qua vách trực tràng 1-3 tháng sau khi chuyển phôi. 9: Sinh đẻ (9 tháng sau khi chuyển phôi).

Trong cấy chuyển phôi bằng phương pháp không phẫu thuật, bước quan trọng nhất là đưa một dụng cụ vào như súng cấy chuyển phôi đến cổ và sừng tử cung. Việc sử dụng không cẩn thận các dụng cụ như thế sẽ làm tổn thương cổ cũng như màng tử cung và gây chảy máu. Do đó, chỉ di chuyển các dụng cụ trên khi biết vị trí của chúng và quá trình đưa các dụng cụ vào tử cung luôn được kiểm tra và điều chỉnh qua trực tràng.

Ở các nước phát triển, tỷ lệ đậu thai ở bò sau khi cấy chuyển phôi là 60-70% đối với phôi tươi và 55-65% đối với phôi đông lạnh. Ở Việt Nam, tỷ lệ đậu phôi đạt được thấp hơn: 30-40% đối với phôi tươi và 38-44% đối với phôi đông lạnh (Hoàng Kim Giao 1997).

+ Sinh thiết phôi

Sinh thiết từ phôi sinh đôi cùng trứng có thể xác định được giới tính và các đặc tính di truyền của dòng vô tính. Có thể hút ra một ít tế bào từ phôi để xét nghiệm hoặc dùng dao cắt một phần của phôi.

+ Thụ tinh *in vitro*

Thụ tinh *in vitro* (*in vitro* fertilization) là một kỹ thuật mới của công nghệ sinh học hiện đại nhằm kết hợp giữa trứng và tinh trùng trong ống nghiệm để thu được hợp tử.

Các nhà khoa học đã sử dụng phương pháp thụ tinh nhân tạo để giải quyết vấn đề tính hữu thụ ở người trong nhiều năm qua. Đối với gia súc, kỹ thuật công nghệ sinh học này được sử dụng lần đầu tiên là ở thỏ (Daizien 1971), sau đó ở bò và lợn (Iritani 1978), ở dê (Kim 1981). Năm 1982, một con bê đầu tiên đã được sinh ra bằng thụ tinh *in vitro* (Hanada 1982). Từ đó đến nay kỹ thuật thụ tinh *in vitro* đã được áp dụng rộng rãi trong chăn nuôi bò ở nhiều nước trên thế giới. Nói chung, kỹ thuật thụ tinh *in vitro* bao gồm các bước:

- Trước hết tiến hành thu nhận trứng chưa thụ tinh từ buồng trứng của con cái cho (có thể sử dụng thuốc gây siêu rụng trứng hoặc không). Trứng có thể được thu nhận vào bất kỳ thời gian nào của chu kỳ sinh sản (đối với bò).

- Sau khi được nuôi thành thực trong tủ ấm (khoảng 20-24 giờ đối với bò), trứng được thụ tinh với tinh trùng đã hoạt hóa. Sự hoạt hóa tinh trùng

có thể được thực hiện trong đường sinh dục của con cái hay trong ống nghiệm với môi trường nuôi cấy thích hợp.

- Nuôi hợp tử cho phát triển đến giai đoạn phôi dâu hoặc phôi nang.
- Cấy chuyển các phôi thu nhận được vào con nhận.

Ở bò tỷ lệ thụ thai từ thụ tinh *in vitro* thường nằm trong khoảng từ 40-50%.

Sử dụng thụ tinh *in vitro* cho phép khai thác tiềm năng sinh sản của gia súc cái đơn thai, rút ngắn khoảng cách thế hệ ở các gia súc có vòng đời dài, thành lập ngân hàng gen và công nghiệp hóa ngành chăn nuôi.

3.2.4. Tạo dòng vô tính động vật

Tạo dòng vô tính (somatic cloning) là một thuật ngữ được dùng để chỉ một tập hợp cá thể (từ hai trở lên) có xuất xứ từ một cá thể ban đầu qua quá trình sinh sản vô tính. Tạo dòng vô tính vật nuôi đã và đang phát triển với một số các kỹ thuật:

+ Chia tách phôi

Với kỹ thuật này có thể cho ra hai hay nhiều phôi từ một phôi ban đầu, tạo ra hàng loạt các cá thể giống hệt nhau về mặt di truyền hay nói cách khác là tạo nên một dòng vô tính.

Có hai phương pháp chia tách phôi (embryo splitting): phương pháp dùng kim (Hình 3.6) và phương pháp dùng dao cắt. Phương pháp dùng dao thì đơn giản hơn và dễ dàng hơn nhiều so với phương pháp dùng kim. Để thực hiện chia tách phôi cần phải có dung dịch nuôi phôi, kính hiển vi soi ngược (inverted microscope), thiết bị vi thao tác để điều khiển kim hoặc dao cắt, kim giữ để cố định phôi...



Hình 3.6. Tách phôi bằng kim

Trước hết cho phôi dùng để chia tách vào đĩa petri chứa dung dịch nuôi cấy; cố định phôi bằng kim giữ; điều khiển thiết bị vi thao tác để dịch chuyển dao cắt theo hướng thẳng đứng từ trên xuống hay theo hướng nằm ngang sao cho lưỡi dao đặt đúng vào giữa khối tế bào phôi; cắt phôi thành hai, chú ý thao

tác nhanh, dứt khoát và chính xác; chuyển phôi sau khi tách vào dung dịch nuôi mới để nuôi cấy khoảng 2-3 giờ trước khi chuyển vào vật nhận đã được gây động dục đồng pha; cũng có thể nuôi cấy và tiếp tục chia tách lặp lại thu nhận được nhiều phôi hơn.

Phôi được sử dụng để chia tách ít nhất là ở giai đoạn 5-7 ngày sau khi thụ tinh (đối với bò). Nếu sử dụng phôi ở giai đoạn cuối phôi dâu hay đầu phôi nang khi khối tế bào đủ lớn và các tế bào chưa biệt hoá thì kết quả chia tách phôi nói chung là sẽ tốt hơn. Nếu chia tách phôi ở giai đoạn phôi dâu thì chỉ việc chia khối mầm phôi thành hai phần đều nhau. Còn nếu chia tách phôi ở giai đoạn phôi nang thì ngoài việc tách nội phôi bì thì còn phải tách phần ngoại phôi bì. Nếu tách phôi ở giai đoạn muộn hơn, lúc các tế bào đã biệt hóa thì tỷ lệ tạo nên những cơ thể toàn vẹn là thấp.

Vào năm 2001, lần đầu tiên ở Việt Nam các nhà khoa học ở Viện Chăn nuôi quốc gia đã thành công trong việc tạo một dòng vô tính bò gồm hai cá thể bằng phương pháp chia tách phôi làm đôi.

+ Chuyển ghép nhân

Phương pháp chuyển ghép nhân (nuclear transplantedation) tạo nên các dòng vô tính đã thành công ở nhiều loài gia súc như cừu, bò, ngựa, lợn, dê. Đây là một phương pháp hiện đại nhằm chuyển toàn bộ vật chất di truyền (DNA chứa trong nhân) từ một tế bào phôi sớm vào một tế bào trứng chưa thụ tinh đã tách nhân đi để tạo nên tế bào lưỡng bội (hợp tử) và phát triển thành phôi.

Kỹ thuật chuyển nhân bao gồm các bước cơ bản sau (Hình 3.7):

- Trước hết, gây siêu bài noãn, thụ tinh, rồi thu nhận phôi tốt nhất là ở giai đoạn phôi dâu.

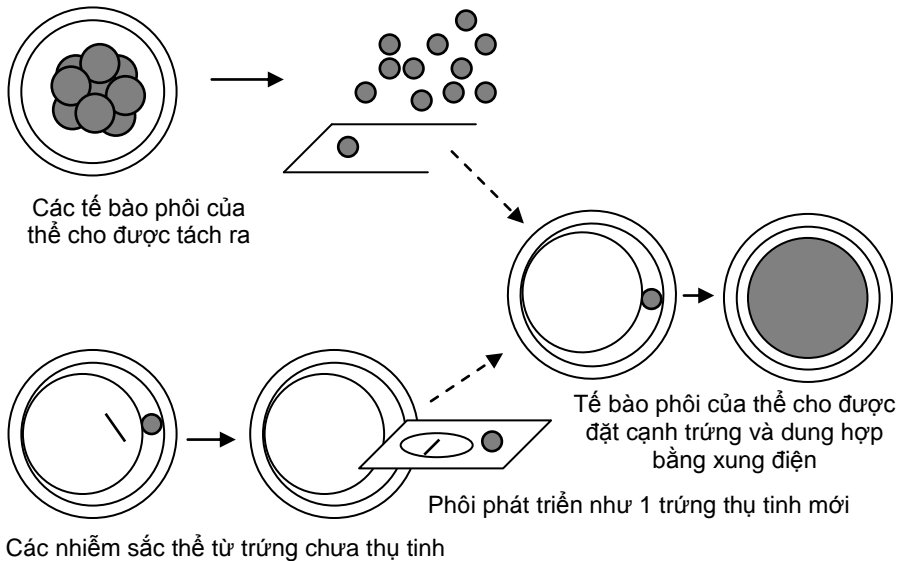
- Tách khối tế bào phôi dâu thành từng tế bào riêng lẻ. Các tế bào cho này được sinh trưởng dưới những điều kiện đặc biệt trong môi trường nuôi cấy. Bằng cách này số lượng tế bào có thể được tăng lên. Cũng có thể thực hiện các biến đổi di truyền và chọn các tế bào đã biến đổi như mong muốn để nhân chúng lên.

- Dung hợp các tế bào trên với tế bào trứng chưa thụ tinh không nhân bằng xung điện tạo thành phôi.

- Phôi tạo thành được nuôi cấy *in vitro* hoặc đưa vào nuôi ở vật nhận trung gian thường là thỏ hoặc cừu.

- Sau một thời gian, chuyển các phôi đã phát triển này vào các vật nhận đã được gây động dục đồng pha.

Kỹ thuật chuyển nhân cho phép tăng số lượng cá thể con của động vật cái, có thể đạt đến hàng trăm hoặc hàng ngàn. Nói cách khác, nó cho phép có thể tạo ra các nhóm động vật giống hệt nhau về mặt di truyền mang một tính trạng mong muốn nào đó, đem lại hiệu quả cao trong nhân giống, trong cải tiến di truyền các giống vật nuôi.



Hình 3.7. Kỹ thuật chuyển ghép nhân.

3.2.5. Tạo dòng cừu Dolly

Năm 1996, lần đầu tiên trên thế giới một động vật đã được tạo dòng thành công bởi nhà phôi học Ivan Wilmut và cộng sự ở Viện Roslin của Scotland đó là cừu Dolly (Hình 3.8).

Phương pháp sử dụng để tạo cừu Dolly có thể tóm tắt như sau (Hình 3.9):

- Tế bào trứng của cừu cái giống Scottish Blackface chưa thụ tinh ở kỳ giữa II đã được loại bỏ nhân.

- Tế bào tuyến vú của cừu cái giống Finn Dorset, 6 năm tuổi đang ở giai đoạn 3 tháng cuối của thời kỳ mang thai, được nuôi cấy trong môi trường nghèo chất dinh dưỡng để đi vào pha định vị của chu kỳ tế bào (pha G₀).

- Hai tế bào trên được dung hợp bằng xung điện.

- Các tế bào phát triển trong môi trường nuôi cấy thành phôi. Phôi được cấy vào một cừu mẹ thay thế đã được tiêm hormone cần thiết.

- Phôi đã phát triển đến giới hạn và kiểu DNA đã xác định Dolly là một dòng vô tính, là bản sao của cừu Finn Dorset .

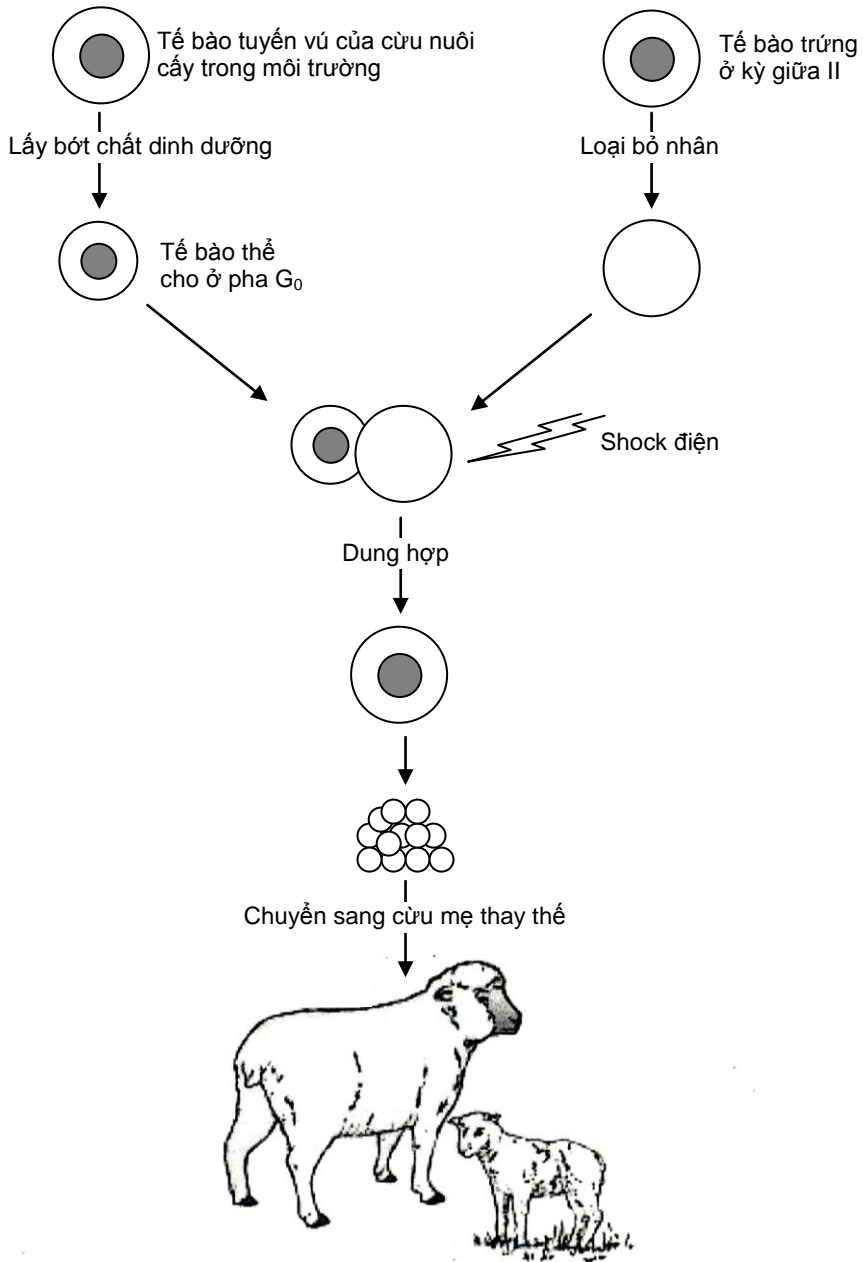
Từ 277 phôi tạo thành bằng phương pháp này đã được đưa vào nuôi cấy, cuối cùng chỉ có một phôi phát triển thành thai rồi thành cừu con. Cừu Dolly sinh ngày 5 tháng 7 năm 1996, có trọng lượng bình thường, không có biểu hiện dị dạng gì. Tiếp theo đó, các nhà nghiên cứu này cũng đã tạo được 3 cừu con từ các tế bào của một thai 26 ngày tuổi và 4 cừu con từ các tế bào của một phôi 9 ngày tuổi.



Hình 3.8. Cừu Dolly và cừu mẹ của nó.

Sau đó nhiều động vật khác đã ra đời bằng phương pháp này. Năm 1998, sử dụng phương pháp vi tiêm nhân vào trứng đã loại bỏ nhân, các nhà sinh học của trường Đại học Hawaii đã tạo dòng được hơn 50 chuột nhắt. Các nhà khoa học ở công ty PPL Therapeutics ở Edinburgh (Scotland) đã cho ra đời 5 con lợn tạo dòng vào ngày 5 tháng 3 năm 2000 bằng cách sử dụng vật chất di truyền từ một tế bào của một lợn cái trưởng thành. Một

nhóm các nhà khoa học Nhật Bản cũng đã thành công trong việc tạo dòng bê....



Hình 3.9. Quy trình tạo dòng cừu Dolly.

Cừu Dolly đã chết vào năm 2003 do bị ung thư phổi, một bệnh phổ biến được tìm thấy ở các cừu già. Kết quả phân tích DNA cho thấy các đầu của nhiễm sắc thể (telomere) của cừu Dolly ngắn hơn so với bình thường.

3.3. Sản xuất vaccine thú y

Vaccine DNA tái tổ hợp được điều chế bằng cách biến nạp gen kháng nguyên bề mặt đặc hiệu của tác nhân truyền nhiễm vào *E. coli*. Mục đích là để tạo dòng gen mã hóa protein kháng nguyên bảo vệ và biểu hiện cao gen tạo dòng này. Sau đó protein tinh chế được tiêm chủng vào một cơ thể với một protocol chuẩn và cơ thể đó tăng phản ứng miễn dịch với protein tái tổ hợp. Nếu thành công, sau đó cơ thể đã được tiêm chủng sẽ đạt hiệu quả cao trong cuộc đọ sức với tác nhân truyền nhiễm. Phương pháp này được tinh chế hơn nữa nếu có thể xác định được vùng protein kháng nguyên bề mặt trội miễn dịch (immunodominant). Đây là yếu tố quyết định kháng nguyên bảo vệ. Các chuỗi peptide nhỏ được tổng hợp liên kết với một phân tử thể mang và được sử dụng như nguồn kháng nguyên duy nhất dẫn đến phản ứng miễn dịch bảo vệ.

Phương pháp này đã đem lại các kết quả to lớn khi áp dụng để sản xuất vaccine chống sốt rét. Bệnh sốt rét trên thế giới là một bệnh truyền nhiễm đặc biệt gây nên tình trạng bệnh tật và tỷ lệ tử vong lớn. Nguyên nhân là do loài ký sinh trùng *Plasmodium*. Các sporozoite là một giai đoạn trong chu kỳ sống của *Plasmodium* được tiêm vào trong máu do muỗi cái *Anopheles* khi nó lấy máu để nuôi dưỡng trứng. Giai đoạn này biểu hiện một kháng nguyên bề mặt chủ yếu gây ra phản ứng miễn dịch. Gen mã hóa kháng nguyên này đã được tạo dòng sử dụng kháng thể đơn dòng để sàng lọc thư viện biểu hiện DNA tái tổ hợp ở *E. coli*. Thư viện DNA plasmid này chứa cDNA của *Plasmodium* (đã được tổng hợp bằng cách sử dụng mRNA sporozoite) dung hợp với một promoter của *E. coli*. Khi biểu hiện gen dung hợp, cDNA mã hóa kháng nguyên bề mặt của sporozoite được tách ra. Trình tự nucleotide của cDNA tái tổ hợp đã tách ra này cho phép tổng hợp các peptide bắt chước (mimicked) epitope trội miễn dịch. Công việc chính được thực hiện ở *Plasmodium knowlesi*, ký sinh trùng gây ra sốt rét ở khỉ, nhưng lại được mở rộng một cách nhanh chóng đối với việc tách chiết các gen kháng nguyên bề mặt từ các dòng gây ra sốt rét ở người *P. falciparum* và *P. vivax*. Phương pháp này đang được áp dụng một cách rộng rãi và nhanh

chống để sản xuất một số vaccine kháng virus và kháng ký sinh trùng (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Các vaccine được sản xuất bằng phương pháp DNA tái tổ hợp.

Vaccine	Gen tạo dòng
<p>Virus</p> <p>Viêm gan B</p> <p>Cúm</p> <p>Herpes</p> <p>Lở mồm long móng</p> <p>HIV (HTLVIII, LAV)</p>	<p>Kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HbsAg)</p> <p>Hemagglutinin/Neuraminidase</p> <p>Các tiểu đơn vị bao bọc khác nhau (various coat subunits)</p> <p>Protein capsid VP1</p> <p>Kháng nguyên bề mặt</p>
<p>Ký sinh trùng</p> <p><i>Plasmodium</i> (sốt rét)</p> <p><i>Trypanasoma</i> (bệnh ngủ)</p> <p><i>Shistosoma</i></p> <p>Giun tóc (<i>Trichnella</i>)</p> <p>Giun chỉ (<i>Filaria</i>)</p>	<p>Kháng nguyên bề mặt sporozoite</p> <p>Kháng nguyên bề mặt merozoite</p> <p>Kháng nguyên bề mặt</p> <p>Kháng nguyên bề mặt</p> <p>Kháng nguyên bề mặt</p>

Một phương pháp khác được sử dụng để sản xuất vaccine là dùng genome virus đậu mùa tái tổ hợp. Trong phương pháp này, DNA qui định epitope kháng nguyên bề mặt từ các virus như viêm gan B hoặc cúm A hay từ các ký sinh trùng như *Plasmodium* được tạo dòng ở trong genome virus đậu mùa. Các gen đã tạo dòng này được biểu hiện nhờ promoter virus đậu mùa. Sự tiêm chủng virus đậu mùa tái tổ hợp vào một cá thể tạo ra sự nhiễm trùng cục bộ và sinh sản của virus với sự biểu hiện các sản phẩm của gen từ

genome tái tổ hợp. Trong quá trình này vật chủ biểu hiện bệnh đậu mùa và kháng nguyên tái tổ hợp và hy vọng tăng phản ứng miễn dịch bảo vệ cơ thể với chúng. Đây là phương pháp sản xuất vaccine đa trị (polyvalent vaccine). Trong ví dụ mang tính chất lý thuyết nêu trên, sự tiêm chủng một vaccine tái tổ hợp chứa các epitope tạo dòng này có thể làm cho vật chủ miễn dịch với bệnh đậu mùa, viêm gan B, cúm và *Plasmodium*.

3.4. Sản xuất kháng thể đơn dòng

Phản ứng của hệ thống miễn dịch với bất cứ kháng thể nào, ngay cả kháng thể đơn giản nhất, là đa dòng (polyclonal antibody). Cho dù chúng ta tách chiết một tế bào tiết kháng thể riêng lẻ và đưa vào trong môi trường nuôi cấy, nó sẽ chết sau một vài thế hệ do khả năng sinh trưởng giới hạn của tất cả các tế bào soma bình thường. Vấn đề này đã được giải quyết khi Kohler và Milstein phát minh ra kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng vào năm 1975 và công trình này đã được trao giải thưởng Nobel vào năm 1984.

Tế bào B có khả năng tổng hợp kháng thể nhưng không có khả năng phân chia. Ngược lại tế bào u tủy có khả năng tăng sinh không kiểm soát nhưng không tạo thành kháng thể. Kohler và Milstein đã tìm ra cách kết hợp khả năng sinh trưởng không giới hạn của tế bào u tủy với tính đặc trưng của kháng thể xác định trước của các tế bào lách miễn dịch bình thường. Họ đã tiến hành dung hợp các tế bào u tủy với các tế bào B đã hoạt hóa để tạo ra các tế bào lai.

Trộn các tế bào lách của chuột đã gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn với các tế bào u tủy. Sử dụng một tác nhân để các màng sinh chất kết dính dễ dàng dung hợp. Tuy nhiên tỷ lệ thành công là quá thấp. Vì vậy, người ta sử dụng các tế bào u tủy đã mất khả năng tổng hợp hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (HGPRT) và mất khả năng tổng hợp kháng thể. Enzyme HGPRT giúp tế bào tổng hợp purine bằng cách sử dụng nguồn hypoxanthine ngoại bào. Bình thường sự vắng mặt HGPRT là không có vấn đề gì đối với tế bào u tủy bởi vì chúng có một con đường thứ hai có thể sử dụng để tổng hợp purine. Tuy nhiên, khi tế bào có mặt aminopterin, chúng không thể sử dụng con đường thứ hai này và lúc này phụ thuộc hoàn toàn vào HGPRT để tồn tại.

- Chuyển hỗn hợp các tế bào dung hợp vào môi trường nuôi cấy nhân tạo HAT (chứa hypoxanthine, aminopterin và thymidine). Các tế bào u tủy

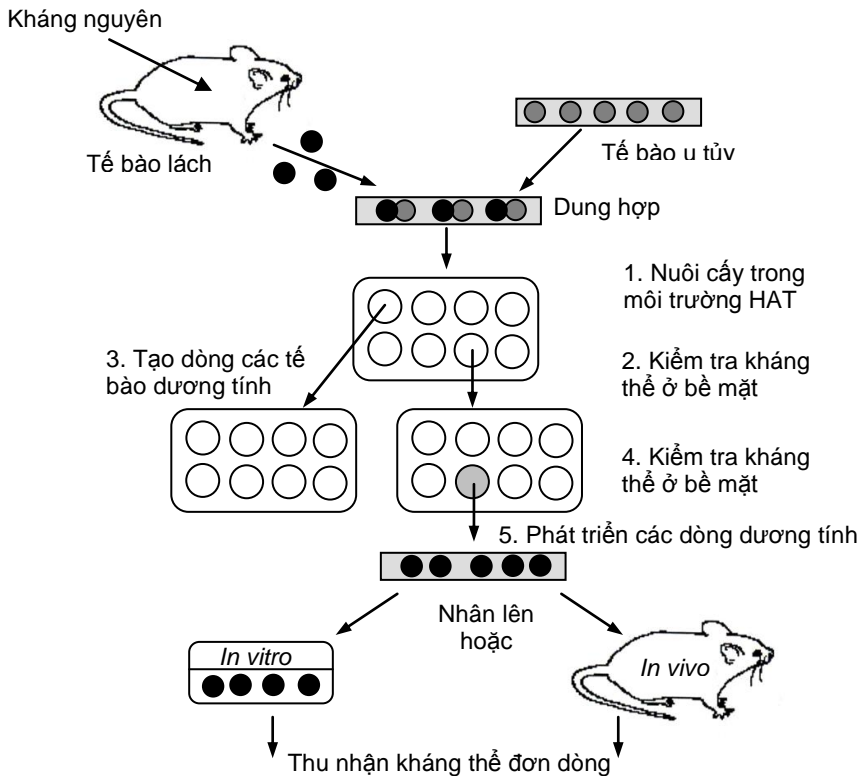
không thể sinh trưởng được vì thiếu HGPRT. Các tế bào lách bình thường không thể sinh trưởng vô hạn bởi vì thời gian sống giới hạn của chúng. Các tế bào lai có thể sinh trưởng vô hạn do tế bào lách cung cấp HGPRT và tế bào u tủy là bất tử.

- Kiểm tra dịch nội mỗi môi trường nuôi cấy để tìm môi trường đã tạo ra kháng thể mong muốn.

- Bởi vì môi trường nuôi cấy gốc có thể được bắt đầu với hai hoặc nhiều tế bào lai nên phải tách các tế bào riêng lẻ từ mỗi môi trường có kháng thể dương tính và nuôi cấy lại chúng.

- Lại tiến hành kiểm tra mỗi dịch nổi đối với kháng thể mong muốn. Mỗi môi trường nuôi cấy lại dương tính đã được bắt đầu từ một tế bào riêng lẻ tương ứng với một dòng và kháng thể của chúng là kháng thể đơn dòng. Điều này có nghĩa là mỗi môi trường nuôi cấy tạo ra một loại kháng thể riêng biệt chống lại trực tiếp một yếu tố xác định riêng lẻ với một kháng nguyên chọn trước.

- Tăng lượng nuôi cấy đối với các dòng đã thành công.



Hình 3.10. Mô hình sản xuất kháng thể đơn dòng.

Nuôi cấy tế bào lai có thể được thực hiện bằng hai con đường:

+ *In vitro*: nuôi cấy trong các bình. Sản lượng tăng từ 10-60 $\mu\text{g/ml}$.

+ *In vivo*: nuôi cấy trong cơ thể chuột. Nồng độ kháng thể trong huyết thanh và trong các dịch khác của cơ thể có thể đạt tới 1-10 mg/ml .

Kháng thể đơn dòng được sử dụng một cách rộng rãi như là thuốc thử trong chữa bệnh và nghiên cứu. Hiện nay, kháng thể đơn dòng được dùng để chống thụ thai, triệt sinh ở gia súc, chẩn đoán có thai, lao, hủi, và còn được dùng để chẩn đoán di căn ung thư nếu có gắn thêm đồng vị phóng xạ. Gần đây nhất, kháng thể đơn dòng còn được dùng để phát hiện AIDS. Sử dụng kháng thể đơn dòng đã nhanh chóng đã thay thế dần cho một số các phương pháp miễn dịch và huyết thanh thông thường để phát hiện một kháng nguyên chưa biết trên bề mặt tế bào, xác định mức hormone để đánh giá chức năng của tuyến nội tiết, xác định và định loại vi sinh vật, phát hiện một số protein có ý nghĩa trong chẩn đoán ung thư, ức chế phản ứng loại thải khi ghép cơ quan....

3.5. Sản xuất protein đơn bào

Protein đơn bào (single cell protein-SCP) là thuật ngữ nói đến sự độc canh (monoculture) tế bào vi khuẩn hoặc protein tổng số tách chiết được từ các tế bào nuôi cấy tinh khiết mà có thể được sử dụng làm nguồn protein bổ sung cho người và động vật. SCP là thích hợp đối với sự tiêu thụ của con người và động vật, được xem là thức ăn cải tiến. Sử dụng sinh khối vi khuẩn làm nguồn thức ăn là một hướng nghiên cứu quan trọng bởi vì lượng thức ăn trên thế giới không đủ để cung cấp và hàm lượng protein của phần lớn vi sinh vật là rất cao (xấp xỉ 60-80% khối lượng khô của tế bào). Mặt khác, do hàm lượng methionine, lysine, vitamin và các chất khoáng cao nên SCP nhiều dinh dưỡng hơn một số thức ăn thực vật và động vật. Tuy nhiên, có một số hạn chế đối với việc sử dụng phổ biến SCP: hàm lượng nucleic acid trong SCP cao có thể nguy hiểm đối với sức khỏe của một số cơ thể với những rối loạn nhất định; việc có thể có của các chất độc được tiết ra từ các cơ chất sinh trưởng (ví dụ như kim loại nặng) hoặc được tạo ra do vi sinh vật (ví dụ như xạ khuẩn) đòi hỏi phải phân tích kiểm tra chất lượng tốt kém;

sự tiêu hóa chậm của các tế bào vi khuẩn trong ống tiêu hóa có thể gây ra các phản ứng không tiêu hoặc dị ứng ở một số cá thể; giá SCP đắt hơn so với các nguồn protein khác như bột đậu tương.

Nhiều loại vi sinh vật khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm, tảo, xạ khuẩn và nhiều cơ chất khác nhau đã được sử dụng để sản xuất SCP (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Các cơ chất và vi sinh vật được sử dụng để sản xuất SCP.

Vật liệu thô	Vi sinh vật	Loại sinh vật
Carbon dioxide	<i>Spirulina maxima</i>	Cyanobacterium
Nước sữa (lactosse)	<i>Kluyvecomyces fragilis</i>	Nấm men
Alkane dầu mỡ	<i>Candida lipolyrica</i>	Nấm men
Rác cellulose	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Nấm
Methane (Methanol)	<i>Methylophilus methylptrophus</i>	Vi khuẩn

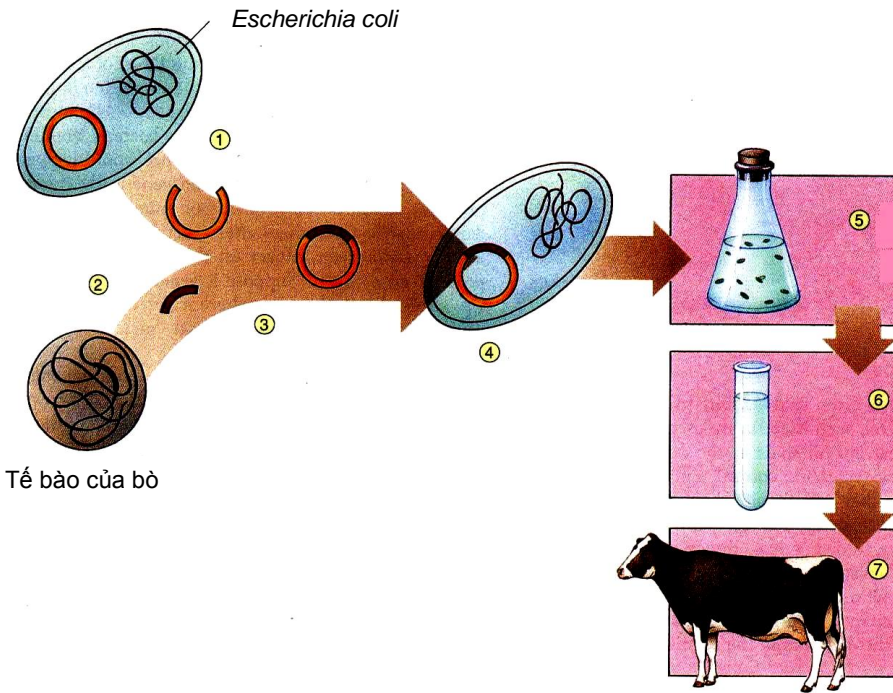
Sản xuất SCP đầu tiên có ý nghĩa đã được thực hiện ở Đức trong chiến tranh thế giới lần thứ nhất. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* sinh trưởng trên nước rỉ đường (nguồn carbon) và muối ammonium (nguồn nitrogen), được sử dụng để làm đặc súp và xúc xích.

Đến năm 1973, dầu mỡ được xem là nguồn tài nguyên dồi dào và rẻ, do đó một số công ty dầu lớn đã bắt đầu các dự án sản xuất SCP sử dụng dầu mỡ hoặc các sản phẩm tinh luyện từ dầu mỡ làm môi trường sinh trưởng. Tuy nhiên, sự quan tâm đối với các dự án này đã bị giảm sút khi giá dầu mỡ tăng lên. Ở thập niên 1970, ngành công nghiệp hóa học Hoàng gia Anh (ICI) đã phát triển thành công quá trình lên men methanol liên tục để sản xuất SCP thương mại từ vi khuẩn *Methylophilus methylptrophus* (được gọi là Prutten). *M. methylptrophus* có thể sử dụng methanol làm cơ chất sinh trưởng, mặc dù trong thực tiễn methane bị biến đổi thành methanol và methanol được sử dụng làm cơ chất chính. Năm 1979, ICI đã xây dựng một nhà máy có khả năng sản xuất 50.000 tấn SCP/năm. Tuy nhiên, mặc dù ICI đầu tư rất lớn (200 triệu USD) cũng như các thành tựu kỹ thuật đáng kể của

công nghệ sinh học, nhưng đến khoảng năm 1987 thì SCP không được sản xuất ở nhà máy này nữa vì không mang lại hiệu quả kinh tế.

Gần đây, người ta đã quan tâm phục hồi lại việc sản xuất SCP bằng cách sử dụng các vật liệu như rác, thức ăn thừa (ví dụ celluloses và nước sữa). Một số dự án sử dụng các vi sinh vật tự nhiên, trong khi các dự án khác lại sử dụng các vi sinh vật đã được biến đổi di truyền. Tuy nhiên, bất chấp bản chất của vi sinh vật như thế nào, sự xem xét dưới góc độ kinh tế là yếu tố chính của sự thành công hay thất bại. Có lẽ một quá trình mang tính kinh tế có thể được phát triển để sản xuất SCP từ các sản phẩm của việc xử lý rác.

3.6. Sản xuất hormone sinh trưởng



Hình 3.11. Sơ đồ sản xuất hormone sinh trưởng bò bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp. 1: Cắt plasmid bằng enzyme hạn chế. 2: Gen somatotropin bò được tách chiết từ tế bào. 3: Gen somatotropin được chèn vào plasmid. 4: Plasmid tái tổ hợp lại được đưa vào tế bào vi khuẩn. 5: Vi khuẩn sản xuất

somatotropin bò sinh trưởng trong bình lên men. 6: Thu nhận somatotropin từ vi khuẩn và tinh sạch. 7: Somatotropin bò được đưa vào để tăng sản lượng sữa.

Hormone sinh trưởng (GH) là một protein được tiết ra từ thùy trước tuyến yên của động vật có xương sống. Ở động vật có vú, GH cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển. Trước đây, khi cần sử dụng người ta phải tách chiết GH trực tiếp từ tuyến yên, do đó chi phí quá đắt, giá thành quá cao. Nhờ những thành tựu trong lĩnh vực công nghệ DNA tái tổ hợp, người ta đã sản xuất và đưa ra thị trường nhiều loại hormone sinh trưởng phục vụ cho chăn nuôi thú y như hormone sinh trưởng bò (bGH), hormone sinh trưởng lợn (pGH)...

Gen mã hóa hormone sinh trưởng somatotropin là gen hormone sinh trưởng đầu tiên được tạo dòng thành công. Vào năm 1994, Monsanto đã sản xuất thương mại somatotropin tái tổ hợp của bò (bovine somatotropin-BST). Các nông gia sản xuất bơ sữa đã bắt đầu bổ sung hormone sinh trưởng này vào chế độ ăn hàng ngày của bò để tăng khả năng cho sữa của chúng (Hình 3.11). Somatotropin tái tổ hợp còn đang được thử nghiệm như là một phương pháp để tăng trọng lượng cơ của gia súc và lợn cũng như điều trị các rối loạn của người do nhược năng tuyến yên gây ra.

Câu hỏi

1. Hãy trình bày các bước cơ bản trong qui trình tạo động vật chuyển gen?
2. Tại sao nói Công nghệ tạo động vật chuyển gen là một hướng công nghệ cao của Công nghệ sinh học hiện đại phục vụ sản xuất và đời sống?
3. Công nghệ sinh sản ở động vật và các ứng dụng của chúng?
4. Các phương pháp sản xuất vaccin thú y tái tổ hợp?
5. Kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng?

Chương 4

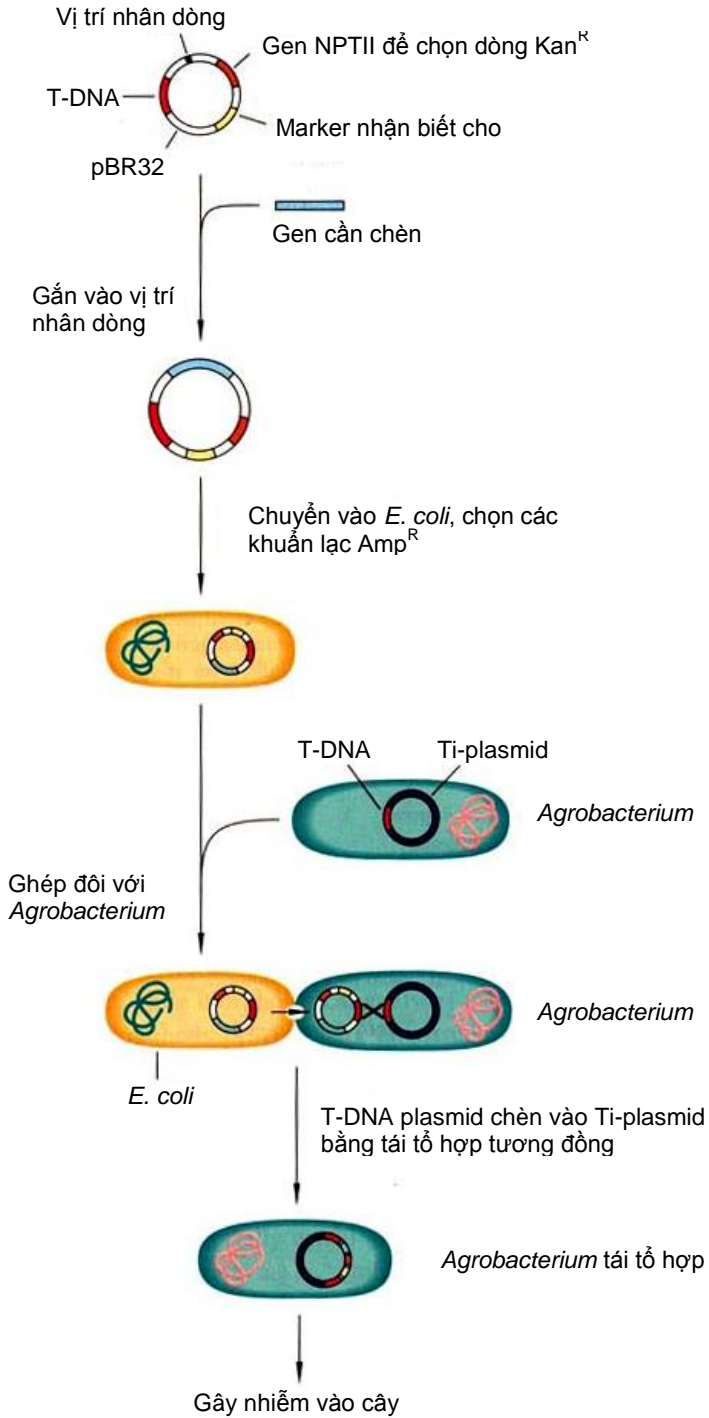
Những lợi ích và thách thức của cây trồng chuyển gen

Cây trồng chuyển gen (transgenic crops) hay còn gọi là cây trồng biến đổi gen (genetically modified crops) (Hình 4.1 và 4.2) hiện đang là vấn đề được cả thế giới tranh luận. Song không thể phủ nhận hiệu quả của nó trong sản xuất cùng lợi ích kinh tế rất lớn do nó mang lại. Hiện nay, công nghệ sinh học trên thế giới phát triển với tốc độ chóng mặt, riêng trong nông nghiệp đã có hơn 60 triệu ha gieo trồng bằng các giống cây biến đổi gen như: ngô, lúa, đậu tương, bông, hoa hướng dương, khoai tây, đu đủ...

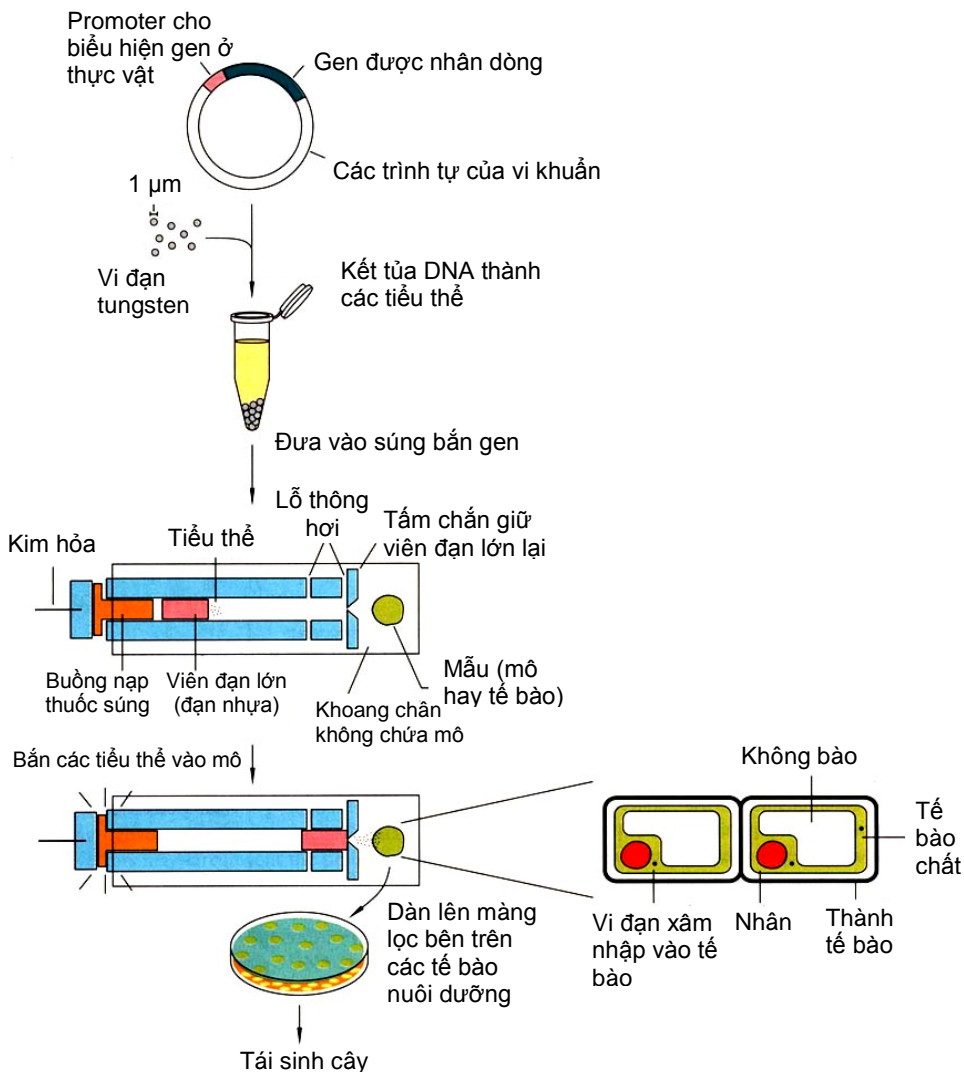
Cây trồng chuyển gen với năng suất và chất lượng cao đã đem lại lợi ích khổng lồ cho những quốc gia có nền công nghệ sinh học tiên tiến. Đồng thời giảm được việc sử dụng thuốc trừ sâu-phân bón hóa học vốn làm suy kiệt tài nguyên thiên nhiên và phá vỡ cân bằng sinh thái, ảnh hưởng nghiêm trọng đến khí hậu toàn cầu.

Những nghiên cứu hiện nay cho phép tạo ra các loại cây lương thực “thế hệ đầu tiên” có khả năng chống lại các stress của môi trường như hạn hán, sự thay đổi nhiệt độ đột ngột hay đất nhiễm mặn... Các nhà khoa học trên thế giới đang nghiên cứu “thế hệ thứ hai” của các sản phẩm công nghệ sinh học-những sản phẩm mang lại lợi ích trực tiếp cho người tiêu dùng. Chẳng hạn, cây “lúa vàng” có hàm lượng β -carotein cao, hoặc giống khoai tây công nghệ sinh học có hàm lượng protein cao hơn giống bình thường. Cây trồng cũng có thể tạo ra các loại vaccine thực phẩm (edible vaccine), đem lại những loại thuốc có chi phí sản xuất và bảo quản thấp. Đây là một trong nhiều nghiên cứu mũi nhọn nhằm thúc đẩy phát triển ngành lương thực cũng như dược phẩm thế giới. Những triển vọng mà cây chuyển gen mang lại là vô cùng to lớn.

Hiện nay, các mặt trái mà người ta đề cập về công nghệ sinh học nông nghiệp vẫn còn dừng lại ở khía cạnh lý thuyết và khả năng. Còn những ưu điểm của loại công nghệ này đã được thực tế chứng minh và kiểm nghiệm.



Hình 4.1. Sơ đồ chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*.



Hình 4.2. Sơ đồ chuyển gen bằng súng bắn gen.

4.1. Sử dụng cây trồng chuyển gen

Hiện nay, những sản phẩm lương thực-thực phẩm do công nghệ sinh học tạo ra đã có mặt trên thị trường. Những cây trồng được biến đổi gen vẫn giống những cây trồng truyền thống nhưng chúng có thêm một số đặc điểm được cải thiện. Chúng không những có lợi cho nông dân mà còn cho cả người tiêu dùng. Người nông dân gặt hái được những vụ mùa bội thu, trong khi người tiêu dùng quanh năm lại có nhiều loại sản phẩm để lựa chọn.

Ngoài ra, những giống mới được tạo ra bằng công nghệ sinh học còn có tiềm năng bảo vệ môi trường.

Trên thị trường hiện nay, đã có một số loại cây trồng công nghệ sinh học được cải thiện tình trạng và chất lượng như:

- Có khả năng chống chịu bệnh.
- Cho phép giảm sử dụng thuốc trừ sâu.
- Tăng thành phần dinh dưỡng.
- Tăng thời gian bảo quản (Bảng 4.1).

Bảng 4.1. Một số cây trồng công nghệ sinh học chủ yếu hiện nay.

Cây trồng	Đặc điểm mới
Cải dầu	Kháng thuốc diệt cỏ
Cải dầu	Hàm lượng laurate cao
Cải dầu	Hàm lượng oleic acid cao
Ngô	Kháng thuốc diệt cỏ
Ngô	Kháng côn trùng
Bông	Kháng thuốc diệt cỏ
Bông	Kháng côn trùng
Đu đủ	Kháng virus
Khoai tây	Kháng côn trùng
Khoai tây	Kháng virus
Đậu tương	Kháng thuốc diệt cỏ
Đậu tương	Hàm lượng oleic acid cao
Bí	Kháng virus
Cà chua	Chín chậm
Cà chua	Kháng virus

Chú thích

- **Thuốc diệt cỏ (herbicide):** Các chất hóa học thường xuyên được sử dụng trong nông nghiệp để kiểm soát cỏ dại vốn gây ảnh hưởng tới nước, ánh sáng và các chất dinh dưỡng trong đất.

- **Laurate:** Muối của lauric acid, một acid béo quan trọng có trong xà phòng và các chất tẩy, có nguồn gốc chủ yếu từ dầu dừa và dầu cọ. Loại dầu cải mới này đang được dùng trong công nghiệp thực phẩm để làm lớp phủ ngoài kẹo chocolate, bánh ngọt, lớp kem, bơ, thậm chí nó còn được sử dụng trong công nghiệp mỹ phẩm.

- **Oleic acid:** Đây là acid béo có một liên kết không no. Về góc độ dinh dưỡng thì những chất béo không no được xem là tốt hơn so với các chất béo no có ở thịt bò, lợn, phomat và một số thức ăn thường ngày khác.

- **Ngô và bông kháng côn trùng (sâu đục thân):** Là loại ngô hoặc bông chuyển gen sản xuất một loại protein tinh thể (crystal protein) có nguồn gốc từ vi khuẩn đất trong tự nhiên (Bt-*Bacillus thuringiensis*). Protein này cho phép cây ngô hoặc cây bông có khả năng kháng ổn định đối với sâu đục thân. Ngô Bt cũng làm giảm sự nhiễm độc do nấm trên những vết thương hở (Hình 4.3).



Hình 4.3. Ngô chuyển gen kháng côn trùng ở Mexico.

- **Đu đủ kháng virus:** Đu đủ mang một gen của virus mã hóa cho protein vỏ (coat protein: thành phần của virus, chức năng cơ bản của các protein vỏ là bảo vệ thông tin di truyền của virus) của virus đốm vòng ở đu đủ (PRSV). Protein này tạo cho cây đu đủ khả năng tự bảo vệ chống lại PRSV. Một gen từ nguồn bệnh đã được sử dụng để kháng lại chính nó (Hình 4.4).

- **Khoai tây kháng côn trùng:** Khoai tây mang một gen sản xuất protein kháng sâu tạo cho nó khả năng tự bảo vệ trước bọ khoai tây Colorado (Hình 4.5).

- **Khoai tây kháng virus:** Đã có một vài giống khoai tây được chuyển gen nhằm kháng virus xoắn lá khoai tây (PLRV) và virus khoai tây Y (PVY). Loại khoai tây này được chuyển gen của virus để tự kháng lại virus.

- **Bí kháng virus:** Có khả năng kháng virus khảm vàng zucchini. Phương pháp công nghệ sinh học này tiết kiệm được chi phí chống rệp cây (vector mang virus) và từ đó giảm hoặc hạn chế hoàn toàn việc sử dụng thuốc trừ sâu (Hình 4.6).

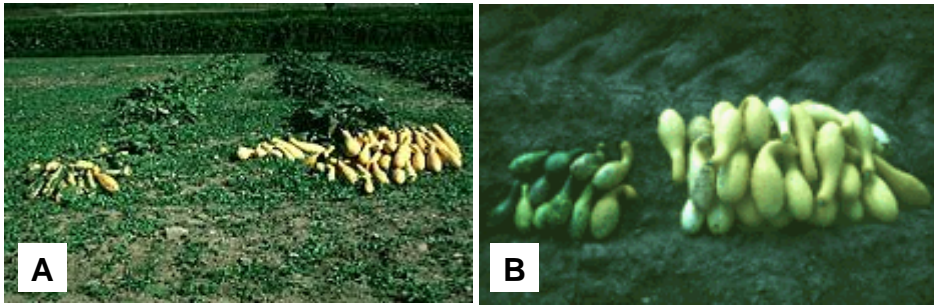
- **Cà chua chín chậm:** Là loại thực phẩm chuyển gen đầu tiên được sản xuất ở các nước phát triển. Giống cà chua này có thời gian lưu trên quầy bán hàng dài hơn. Nó mang một gen làm chậm quá trình mềm quả tự nhiên khi quả chín. Loại này giữ được trên cây lâu hơn so với các giống khác, vì vậy có thể bảo quản tươi lâu hơn. Hơn nữa, thời gian lưu giữ trên quầy bán hàng dài hơn đã tăng giá trị thương mại sau thu hoạch và bảo quản, giảm giá thành sản phẩm.



Hình 4.4. Cây đu đủ trồng ở Thailand. Bên phải hình A là cây chuyển gen kháng virus đốm vòng và bên trái hình A là cây không chuyển gen (bên trái hình A). Hình B giới thiệu các quả đu đủ chuyển gen đã phát triển khỏe mạnh.



Hình 4.5. Khoai tây chuyển gen kháng côn trùng.



Hình 4.6. Bí chuyển gen kháng virus khảm vàng zucchini. A: Ruộng bí chuyển gen. B: Quả bí không chuyển gen bị nhiễm virus (bên trái) và quả bí chuyển gen phát triển bình thường.

Nhìn chung, việc sử dụng các giống cây trồng chuyển gen có thể đem lại lợi nhuận đáng kể cho các nước đang phát triển. “Thế hệ đầu tiên” của những giống cây này đã chứng minh được khả năng tăng năng suất cây trồng, giảm giá thành sản phẩm, tăng lợi nhuận nông nghiệp và góp phần bảo vệ môi trường. Hiện nay, các nghiên cứu đang hướng đến các cây trồng biến đổi gen “thế hệ thứ hai”, tập trung vào việc tăng chất lượng dinh dưỡng và khả năng chế biến. Các giống cây trồng này sẽ khẳng định được giá trị của chúng ở những quốc gia có hàng triệu người dân bị thiếu hụt thực phẩm. Tuy nhiên, liệu các thực phẩm công nghệ sinh học này có an toàn hay không chúng ta sẽ thảo luận trong các phần sau.



Hình 4.7. Đậu tương chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ.



Hình 4.8. Cà chua chuyển gen kháng virus khảm ở cây dưa chuột CMV (cucumber mosaic virus). A: Cây không chuyển gen bị nhiễm CMV. B: Cây chuyển gen sinh trưởng bình thường.

4.2. Các nghiên cứu về sự an toàn của cây chuyển gen

4.2.1. Xác nhận sự chuyển gen bằng hạt phấn

Cho đến nay, không có hạt phấn của loại cây trồng chuyển gen nào được hạn chế khả năng phát tán. Điều này có nghĩa là trong tương lai cần phải xác định và quản lý sự dịch chuyển của hạt và hạt phấn. Các phương thức quản lý như cách ly không gian và thời gian có thể được sử dụng để hạn chế sự lưu chuyển gen (gene flow) giữa cây trồng, hạn chế hạt sót lại trong đất và cây sót lại sau khi thu hoạch. Việc sử dụng vùng cách ly, rào cản cây trồng và các rào cản thực vật khác giữa nguồn tạo và nơi nhận hạt phấn cũng có thể làm giảm mức độ phát tán hạt phấn. Thời gian hạt phấn ở trong không khí cũng khá dài, do đó có thể phát tán đến khoảng cách khá xa. Nghiên cứu của Reheul (1987) đã ghi lại sự phát tán hạt phấn nhờ gió có khoảng cách 1000 m. Tuy nhiên, điều kiện thời tiết và môi trường thay đổi có thể gây ra sự phát tán ở những khoảng cách xa hơn. Các biện pháp cách ly sinh học đang được phát triển để xác định liệu sự sinh sản ở cây trồng có thể kiểm soát được hay không để tránh sự giao lưu gen qua hạt hoặc hạt phấn.

Đặc biệt ở các giống hoặc dòng có cây bắt dục đực, sẽ xảy ra hiện tượng lai xa với giống biến đổi gen hữu thụ với tần số cao hơn và khoảng cách xa hơn so với giống truyền thống. Sự tích lũy gen (gene stacking) đã

được quan sát ở cây trồng và người ta dự đoán là cây trồng mang gen đa kháng sẽ trở nên phổ biến sau khi cây trồng chuyển gen được phép đưa vào thị trường, và vì vậy cây mọc hoang biến đổi gen sẽ phải cần các biện pháp diệt cỏ khác.

Các nghiên cứu cho thấy phần lớn sự thụ phấn chéo xảy ra ở khoảng cách ngắn và khả năng thụ phấn thành công giảm theo hàm mũ so với khoảng cách từ nguồn phát ra hạt phấn. Theo Timmons và Thompson (1995), ở phạm vi nông trại vẫn có sự lưu chuyển gen ở mức độ rất thấp xảy ra trên khoảng cách khá xa, vì vậy sự tách biệt hoàn toàn về mặt di truyền rất khó duy trì.

Trong khi hạt phấn đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo không gian thì hạt giống đóng vai trò quan trọng trong sự phát tán theo thời gian. Vì vậy, khi cách ly cây trồng chuyển gen với cây trồng không chuyển gen phải tính đến chuyện trước đó cây trồng chuyển gen có được trồng trên cùng mảnh đất đó không và tập quán canh tác có gây ra sự di chuyển các hạt giữa các mảnh ruộng hay không.

Sự lưu chuyển gen giữa cây biến đổi gen và họ hàng của nó còn tùy thuộc vào loại tính trạng gen chuyển quy định, đặc điểm sinh học của cây (thụ phấn chéo hoặc tự thụ phấn) và bối cảnh nông nghiệp (hệ thống cây trồng, tổ chức không gian giữa các thửa ruộng). Raybould và Clarke (1999) cho rằng vì gen chuyển tuân theo quy luật di truyền Mendel nên sự lưu chuyển gen giữa các quần thể tự nhiên là một “mô hình sinh học phù hợp” cho việc dự đoán sự lưu chuyển gen trong và giữa các quần thể cây trồng và họ hàng của chúng.

Dưới đây là một số loài cây trồng quan trọng được mô tả là có nguy cơ lưu chuyển gen giữa các cây trồng và từ cây trồng vào cây hoang dại ở mức độ từ thấp đến cao.

+ Cây cải dầu

Cải dầu được xem là cây trồng chuyển gen có nguy cơ lưu chuyển gen sang cây trồng khác và sang họ hàng hoang dại ở mức độ cao. Cải dầu lai được với một số họ hàng hoang dại, vì vậy có khả năng lưu chuyển gen vào các giống này.

Tính trạng chủ yếu trong cây cải dầu chuyển gen là các gen kháng thuốc diệt cỏ. Ngoài ra, chúng cũng đã được biến nạp để thay đổi về lượng và loại dầu tạo ra, ví dụ: tăng hàm lượng stearic acid và đưa gen sản xuất lauric acid vào.

Có thể sử dụng các hệ thống quản lý để giảm thiểu sự phát tán hạt cây cải dầu biến đổi gen, giảm thiểu số lượng hạt giống/m² và quần thể cây mọc hoang. Người ta đã đề xuất khoảng cách 100 m để ngăn cách giữa cây cải dầu chuyển gen và dòng cải dầu bình thường có khả năng sinh sản đầy đủ. Tuy nhiên, đến nay người ta đã biết rõ các dòng hoặc giống cải dầu có cây bất dục sẽ lai xa với dòng cải dầu chuyển gen ở tần số cao hơn trên một khoảng cách xa hơn.

+ Cây củ cải đường

Hạt phấn từ cây củ cải đường đã được ghi nhận phát tán ở khoảng cách hơn 1 km với tần số khá cao. Thụ phấn chéo ở cây trồng lấy củ thường không được đặt thành vấn đề vì chúng được thu hoạch trước khi ra hoa. Tuy nhiên, một số cây trồng sẽ lọt ra ngoài và sự lưu chuyển gen giữa chúng vẫn có thể xuất hiện. Lai xa và nạp gen (introgression)¹ giữa củ cải đường trồng và giống hoang dại được chứng minh là có xảy ra.

Cho đến nay, các nghiên cứu ở củ cải đường chuyển gen chủ yếu tập trung vào tính kháng thuốc diệt cỏ và virus. Củ cải đường là một cây trồng lá rộng và phát triển chậm, do đó khả năng cạnh tranh với cỏ dại thấp. Thông thường, người ta phải dùng thuốc diệt cỏ liều thấp và lặp lại nhiều lần để kiểm soát cỏ dại. Biện pháp này rất tốn kém và điều kiện thời tiết cũng thường làm giảm hiệu quả của thuốc diệt cỏ. Vì vậy, việc tạo ra củ cải đường kháng thuốc diệt cỏ là một triển vọng hấp dẫn cho người canh tác.

Hiện nay, người ta đã chuyển hai gen kháng virus gây bệnh ở rễ và virus gây vàng lá vào củ cải đường. Một khả năng khác là chuyển các gen kháng sâu bọ vào củ cải đường để kiểm soát rệp vừng (vector mang virus gây bệnh vàng lá). Tuy nhiên, nghiên cứu về gen chuyển kháng rệp vừng đang còn ở giai đoạn sơ bộ.

¹ Còn gọi là chuyển gen, tức là chuyển một vài gen từ loài này vào loài khác có bộ genome lưỡng bội đầy đủ.

Do củ cải đường thu hoạch củ nên tỷ lệ cây trồng thất thoát ra ngoài thấp hơn 1%, vì vậy sự lưu chuyển gen do phát tán hạt phấn giữa các cây trồng thu hoạch củ là rất thấp.

Hạt giống của dòng củ cải đường mang các gen thích nghi với môi trường có khả năng ảnh hưởng đến hệ sinh thái hoặc đa dạng di truyền của củ cải đường hoang dại, vì thế cần cách ly giống chuyển gen để hạn chế đến mức tối thiểu sự lưu chuyển gen.

Ở củ cải đường hiện tượng lưu chuyển gen gián tiếp thông qua hạt cũng là một vấn đề đáng quan tâm. Nghiên cứu cho thấy hạt củ cải đường tồn tại trong đất trong một khoảng thời gian đáng kể. Để tránh sự lưu chuyển gen từ cây trồng vào cây hoang dại nên luân canh để giữ cho số lượng hạt giống/m² duy trì ở mức cao.

+ Cây khoai tây

Thụ phấn chéo giữa các cây trồng bằng củ thường không được đặt thành vấn đề, vì củ sau khi thu hoạch không bị ảnh hưởng bởi hạt phấn bám vào. Tuy nhiên, ở các khu vực sản xuất hạt giống, khả năng thụ phấn chéo giữa các cây trồng cạnh nhau dẫn đến tạp nhiễm giống khá cao. Nguy cơ lưu chuyển gen là có nếu để cây mọc hoang phát triển trong ruộng từ vụ này sang vụ khác. Khả năng lai xa và nạp gen giữa khoai tây và các họ hàng hoang dại của nó là rất thấp.

Các tính trạng được biến nạp gen ở khoai tây gồm: kháng nấm, sâu bọ và giun tròn, kháng thuốc diệt cỏ, thay đổi thành phần tinh bột, chống chịu stress và chống bầm dập củ.

Mức độ phát tán hạt phấn ở khoai tây thay đổi tùy thuộc vào giống, điều kiện thời tiết lúc ra hoa, sự có mặt và tần số của các vector thụ phấn. Đa số các nghiên cứu thực địa đã kết luận khả năng phát tán hạt phấn xảy ra trong khoảng 20 m.

Ở châu Âu, sự phát tán hạt phấn từ khoai tây biến đổi gen ít có khả năng ảnh hưởng trực tiếp đến cây trồng thu nhận hạt phấn vì sản phẩm thu hoạch không bị ảnh hưởng đến quá trình thụ phấn và tạo hạt. Ngoài ra, khoai tây được trồng bằng củ thay vì hạt vì vậy sự tạp nhiễm cây chuyển gen sẽ không truyền cho thế hệ con. Tuy nhiên, ở những quốc gia kém phát triển gieo trồng bằng hạt giống có nhiều lợi thế, vì vậy sự thụ phấn chéo dẫn

đến tạp nhiễm giữa các vụ mùa. Ngoài ra, nếu để củ mọc hoang phát triển cũng sẽ dẫn đến nguy cơ nhiễm cây chuyển gen vào cây truyền thống.

+ Cây ngô

Được xem là loại cây trồng có nguy cơ lưu chuyển gen giữa chúng ở mức độ từ trung bình đến cao. Bằng chứng cho thấy ngô biến đổi gen thụ phấn chéo với ngô bình thường ở khoảng cách bằng và lớn hơn khoảng cách cách ly đề xuất là 200 m.

Việc chuyển gen ở ngô bằng *Agrobacterium* đã không dễ như ở các cây trồng khác. Phương pháp thành công nhất để đưa gen vào ngô là bắn gen (bombardment) vào mô nuôi cấy và tái sinh cây. Người ta đã đưa gen kháng kháng sinh và gen chống chịu các loại thuốc diệt cỏ như: glufosinate, glyphosate và bialaphos vào ngô (Harding và Harris 1994). Một thành công đáng kể khác là đưa gen biểu hiện độc tố Bt vào ngô để kiểm soát số lượng sâu bệnh. Tuy nhiên, công nghệ này đang đối mặt với trở ngại lớn theo sau báo cáo gần đây về ảnh hưởng xấu đến ấu trùng bướm sâu bông tai (*Danaus plexippus*).

Các kết quả nghiên cứu cho thấy nhờ gió hạt phấn của giống ngô này có thể thụ phấn cho các giống ngô khác cách xa 800 m. Khoảng cách cách ly để duy trì độ thuần khiết 99% giữa hai thửa ruộng là 200 m, độ thuần khiết 99,5% là 300 m. Khả năng tác động của hạt phấn tăng lên theo kích thước và số lượng ruộng trong trang trại (Treu và Emberlin 2000). Mức độ thụ phấn chéo trong cùng một ruộng phụ thuộc vào độ rộng của ruộng thay vì diện tích nói chung. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy 5 luống đầu tiên bên cạnh nguồn gây tạp nhiễm có chức năng làm lá chắn đối với sự phát tán hạt phấn. Các luống tiếp theo chỉ có chức năng làm loãng độ gây tạp nhiễm. Tỷ lệ thụ phấn chéo với các dòng ngô khác ở gần đó phụ thuộc vào các yếu tố như khoảng cách, rào cản đối với sự di chuyển hạt phấn và điều kiện thời tiết và địa hình ở đó. Nếu có hiện tượng nạp gen giữa giống chuyển gen và giống bình thường thì xác suất cây mọc hoang rất thấp vì khả năng sinh sản của nó bị hạn chế bởi các đặc điểm như không thể rụng hạt tự nhiên.

+ Lúa mạch

Được xem là có nguy cơ lưu chuyển gen giữa các cây trồng và giữa cây trồng với họ hàng hoang dại ở mức độ thấp. Thụ phấn chéo trong điều

kiện thực địa thường liên quan dưới 2% số hoa, vì vậy phần lớn thụ phấn chéo xảy ra ở các cây trồng gần nhau. Cây lai giữa lúa mạch và một số đại mạch hoang dại và các loài cỏ đường như chỉ giới hạn ở F₁ với rất ít bằng chứng về hiện tượng nạp gen ở đời sau do bất thụ.

Lúa mạch là đối tượng được nghiên cứu rất nhiều nhằm tìm kiếm mô hình đáng tin cậy để tạo giống cây biến đổi gen. Các phương pháp được sử dụng để biến nạp gen ở lúa mạch là đưa trực tiếp DNA vào tế bào trần bằng shock điện, hoặc đưa trực tiếp vào tế bào nguyên vẹn bằng súng bắn gen tốc độ cao (high speed microprojectile bombardment). Vasil và cộng sự (1992) đã tạo ra giống lúa mạch chống chịu thuốc diệt cỏ bằng cách bắn gen vào callus phôi. Ngoài ra, còn có phương pháp chuyển gen trực tiếp bằng polyethylene glycol (PEG), dựa vào việc xử lý tế bào phôi trần bằng PEG có mặt DNA ngoại lai. Gần đây, người ta đã phát triển phương pháp tách tế bào trần và tái sinh cây con từ nuôi cấy dịch huyền phù và trong tương lai gần sẽ cho ra đời lúa mạch chuyển gen.

Các tính trạng có thể cải thiện bằng chuyển gen bao gồm: kháng nấm, kháng sâu bệnh, nâng cao sản lượng bằng cách thay đổi vòng đời, hiệu suất quang hợp và sử dụng nước, và chống rệp bằng cách thay đổi chiều cao. Một tính trạng khác cũng được quan tâm là chất lượng của hạt lúa, mà cụ thể là nâng cao đặc điểm nướng bánh từ bột lúa mạch.

Lúa mạch được mô tả là cây trồng có nguy cơ giao lưu gen từ giống biến đổi gen sang giống bình thường và loài hoang dại thấp. Khả năng lai chéo với các họ hàng của nó gần đó cũng bị hạn chế và không có hiện tượng nạp gen ở các thế hệ sau nếu có xảy ra lai chéo.

+ Đại mạch

Cũng tương tự như lúa mạch, đại mạch được mô tả là cây trồng có nguy cơ giao lưu gen từ cây trồng sang cây trồng và từ cây trồng sang họ hàng hoang dại ở mức độ thấp. Đại mạch chủ yếu sinh sản bằng tự thụ, chỉ tạo ra một lượng hạt phấn nhỏ vì thế hầu hết thụ phấn chéo chỉ xảy ra giữa các cây trồng cạnh nhau.

So với các loại lúa mạch khác thì sự phát triển kỹ thuật chuyển gen ở đại mạch diễn ra khá chậm. Biến nạp gen chỉ thực hiện được cho một số kiểu gen hạn chế ở tần số thấp (Harwood và cs 2000). Tuy nhiên, cũng đã có những thành công nhất định và đa số đều sử dụng phương pháp bắn gen vào

phôi chưa trưởng thành. Gần đây đã có thông tin về việc sử dụng *Agrobacterium* để biến nạp gen vào đại mạch. Bào tử đực cũng đã được sử dụng làm đối tượng biến nạp ở đại mạch (Yao và cs 1997). Harwood (2000) cho rằng cần nghiên cứu thêm về quá trình biến nạp để có thể cải thiện mức độ thành công khi chuyển gen.

Nói chung, các tính trạng chuyển gen cho lúa mạch đều có thể áp dụng cho đại mạch, đặc biệt là năng suất và kháng bệnh (DoE 1994). Thay đổi thành phần tinh bột là mối quan tâm của các nhà chế biến đại mạch. Các tính trạng biến đổi gen khác ở đại mạch bao gồm tăng hàm lượng enzyme thủy phân, giảm nitrogen tổng số, tăng hàm lượng tinh bột và tăng hàm lượng lysine.

Được mô tả là cây trồng có nguy cơ giao lưu gen từ cây trồng sang cây trồng và từ cây trồng sang họ hàng hoang dại ở mức độ thấp. Đại mạch chủ yếu sinh sản bằng tự thụ, chỉ tạo ra một lượng hạt phấn nhỏ vì thế hầu hết thụ phấn chéo chỉ xảy ra giữa các cây trồng cạnh nhau. Chưa có số liệu nào về cây lai giữa đại mạch và loài hoang dại.

4.2.2. Nghiên cứu sự bền vững của DNA trong đất

DNA của cây chuyển gen có thể được phóng thích vào môi trường từ các nguyên liệu thực vật đã già hoặc mục nát. Vấn đề này đã được khảo sát đối với cây thuốc lá chuyển gen (aacC1; Paget và cs 1993), cây hoa dã yên chuyển gen (NOS-nptII; Becker và cs 1994) và cây củ cải đường (bar/TR1, TR2/nptII, 35S/BNYVV-cp; Smalla và cs 1995). Sự bền vững của cấu trúc DNA trong đất được phát hiện bằng cách tách chiết DNA trực tiếp từ đất, sau đó khuếch đại PCR (polymerase chain reaction) cấu trúc này. Chọn lọc primer thích hợp cho phép phát hiện rõ ràng cấu trúc chuyển gen bên cạnh các gen xuất hiện tự nhiên. Với phương pháp này sự hiện diện của cấu trúc DNA có thể được phát hiện nhưng không có thông tin nào về sự hiện diện của nó trong nguyên liệu thực vật mục nát có thể do DNA tự do đã được hấp thụ vào bề mặt đất. Độ nhạy của phương pháp phát hiện cũng rất quan trọng thường tùy thuộc vào qui trình tinh sạch DNA và các điều kiện PCR. Giới hạn của sự phát hiện được xác định cho cấu trúc dùng trong cây củ cải đường chuyển gen với 3 cặp primer khác nhau (Bar/TR1, TR2/nptII và 35S-BNYVV-cp) là khoảng 10^2 trình tự đích/gam đất (Gebhard và cs, không công bố). DNA của cây củ cải đường chuyển gen được phát hiện trong mẫu

đất ở vị trí đã không sử dụng từ 6, 12 và 18 tháng sau khi cây củ cải đường bị cày lấp trong đất. Paget và cs (1993) nhận thấy DNA cây thuốc lá chuyển gen có thể phát hiện hơn 1 năm sau khi thu hoạch các cây chuyển gen. Becker và cs (1994) thông báo DNA của cây hoa dã yên chuyển gen chỉ có thể phát hiện ở 3 mẫu đất vào thời điểm 2 tháng sau khi cây được cày lấp trong đất.

Mặc dù chỉ có một vài khảo sát về sự bền vững của DNA cây chuyển gen ở trong đất, nhưng sự bền vững của cấu trúc trong một thời gian dài có thể được chứng minh rõ ràng. Tuy nhiên, không có nghiên cứu nào cho thấy hoặc là DNA được hấp thụ vào các bề mặt khoáng, hoặc vẫn còn phủ lên nguyên liệu thực vật bị thối rữa.

4.2.3. Nghiên cứu sự chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật

+ **Chuyển gen ngang từ thực vật vào vi sinh vật đất**

Chuyển gen ngang (horizontal gene transfer) là hiện tượng chuyển các gen hoặc nguyên liệu di truyền trực tiếp từ một cá thể riêng biệt vào một cá thể khác bằng các quá trình tương tự sự gây nhiễm (infection). Phân biệt với một quá trình bình thường là chuyển gen dọc (vertical gene transfer)-từ bố mẹ vào con cái-xuất hiện trong quá trình sinh sản. Công nghệ di truyền nói chung thường khai thác chuyển gen ngang, vì thế các gen có thể được chuyển giữa các loài xa nhau mà trước đó không bao giờ có thể giao phối trong tự nhiên. Ví dụ, các gen người có thể được chuyển vào lợn, cừu và vi khuẩn. Các gen của cóc có thể được chuyển vào khoai tây. Như vậy, các gen ngoại lai (foreign gene) cũng có thể được đưa vào các cây lương thực.

Chuyển gen ngang trong phần này đề cập đến DNA ngoại lai của cây chuyển gen hiện diện ở trong đất, vi khuẩn phát triển khả năng để nhận gen này và cuối cùng, các trình tự này được hợp nhất trong genome của vi khuẩn.

- Các nhân tố tồn tại tự nhiên (vector) có thể chuyển gen ngang giữa các cá thể là các virus (thường là virus gây bệnh), các plasmid và transposon, đa số trong chúng mang và phát tán các gen kháng thuốc và kháng kháng sinh. Các gen này có thể đi vào tế bào và sau đó sử dụng nguyên liệu của tế bào để nhân lên nhiều bản sao hoặc nhảy vào (cũng như ra ngoài) khỏi genome của tế bào. Các nhân tố tự nhiên bị giới hạn bởi các rào cản loài, ví dụ virus lợn sẽ nhiễm vào lợn nhưng không nhiễm vào người

được, và virus súp-lơ không thể tấn công vào cây cà chua được. Tuy nhiên, công nghệ di truyền sản xuất các vector nhân tạo (mang các gen ngoại lai) bằng cách tái tổ hợp các phần của hầu hết các nhân tố gây nhiễm tự nhiên, nhưng chức năng gây bệnh của chúng bị loại bỏ, và thiết kế lại chúng để khắc phục các rào cản, vì thế các vector này sau đó có thể gắn các gen người để chuyển vào tế bào của tất cả động vật có vú khác, hoặc tế bào thực vật.

- Các gen ngoại lai được đưa vào cùng với các tín hiệu di truyền mạnh-được gọi là promoter (gen khởi động) hoặc enhancer (vùng tăng cường)-để tăng sự biểu hiện của gen cao hơn mức bình thường mà chúng biểu hiện trong tế bào. Các promoter được sử dụng phổ biến nhất là từ các virus thực vật có họ hàng với các virus động vật. Các gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) cũng được đưa vào cùng với các gen quan tâm, sao cho những tế bào hợp nhất thành công các gen ngoại lai vào trong genome của chúng và có thể chọn lọc được. Các gen chỉ thị được sử dụng phổ biến nhất là các gen kháng kháng sinh có nguồn gốc từ các plasmid của vi khuẩn và các transposon, cho phép các tế bào được chọn lọc với các kháng sinh. Các gen chỉ thị này thường duy trì sau đó trong cơ thể được biến đổi di truyền.

- Một promoter thường được dùng cho các cây chuyển gen là từ virus khảm súp-lơ (cauliflower mosaic virus, CaMV), có quan hệ gần gũi với virus viêm gan B, và ít hơn với các retrovirus như AIDS virus. CaMV promoter có thể hoạt động trong hầu hết thực vật, nấm men, côn trùng và *E. coli*. Đây là một promoter mạnh giúp cho gen ngoại lai có thể biểu hiện dư thừa (over-expression) và cũng có thể ảnh hưởng đến các gen của vật chủ nằm xa vị trí của gen ngoại lai chèn vào.

- Sự chèn đoạn của các gen ngoại lai vào trong genome vật chủ không chịu sự kiểm soát của công nghệ di truyền. Nó hoàn toàn ngẫu nhiên và cho hiệu quả không mong đợi, bao gồm các độc tố và các chất gây dị ứng trong các cây lương thực, và ung thư trong các tế bào động vật có vú.

- Nguy cơ của công nghệ di truyền là làm tăng tiềm năng của sự chuyển gen ngang qua các loài không họ hàng. Các cơ chế tế bào cho phép các gen ngoại lai chèn đoạn vào genome cũng có thể di chuyển chúng nhảy ra ngoài một lần nữa. Ví dụ: enzyme integrase xúc tác cho sự hợp nhất của DNA virus trong genome vật chủ, cũng mang chức năng như một disintegrase, xúc tác cho một phản ứng ngược lại. Các gen ngoại lai sau đó

có thể chèn đoạn trở lại vào vị trí khác trong genome, hoặc phát tán không thể kiểm soát tới các cơ thể sống khác.

Các gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc kháng kháng sinh của vi khuẩn thường được sử dụng như là các chỉ thị chọn lọc đối với cây chuyển gen. Vì thế, chuyển ngang (horizontal transfer) của các gen kháng như thế từ thực vật vào vi sinh vật thường được thảo luận như là một hiệu ứng tiềm tàng không mong muốn của cây chuyển gen vào các vi sinh vật đất.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bằng chứng rõ ràng về việc chuyển gen từ thực vật vào các vi sinh vật. Nghiên cứu an toàn sinh học (biosafety) về chuyển gen ngang từ cây chuyển gen vào vi sinh vật (vi khuẩn và nấm) có hai hướng chính sau:

- Tìm hiểu cơ chế chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật.
- Đánh giá các hậu quả sinh thái.

Bức tranh hiềm hoi của việc chuyển gen ngang được mong đợi từ thực vật vào vi sinh vật hiện diện trong mẫu đất và sự nhạy cảm cao của các phương pháp phát hiện được ứng dụng, là đặc biệt quan trọng để làm giảm xác suất sự chuyển gen, vẫn chưa được phát hiện. Để tránh các dấu hiệu dương tính giả (false positive), các phương pháp được dùng phải có tính đặc hiệu cho phép phân biệt rõ ràng cấu trúc từ các gen kháng xuất hiện tự nhiên.

Hầu hết cơ chế có thể cho việc chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật là biến nạp tự nhiên đòi hỏi sự hấp thụ DNA tự do. Vi khuẩn đất khả biến tự nhiên và có thể hợp nhất DNA ngoại lai trong genome của mình. Để chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật ở điều kiện đồng ruộng, không phải chỉ có cơ chế cho phép hấp thụ và sao chép trong một vật chủ mới mà sự chọn lọc vật chủ để biểu hiện một tính trạng mới là quan trọng nhất. Sự phát hiện chuyển gen ngang có thể thực hiện bằng cách phân tích vi khuẩn sau giai đoạn nuôi cấy đầu tiên. Để có được thông tin về sự hiện diện cấu trúc trong loại vi khuẩn không thể nuôi cấy thì phần vi khuẩn phủ trực tiếp trên đất có thể được phân tích để tìm DNA chuyển gen.

+ Chuyển gen từ thực vật vào virus

Kết quả đầu tiên về cây chuyển gen biểu hiện protein vỏ của virus khảm thuốc lá (tobacco mosaic virus, TMV) đã làm chậm sự phát triển của

bệnh xuất hiện trong năm 1986. Cùng phương thức như thế đã được sử dụng sau đó để tạo ra tính kháng cho các loại virus khác nhau, nhưng các nhà di truyền học đã đặt câu hỏi về sự an toàn của cây trồng chuyển gen ngay từ những ngày đầu tiên. Nguy cơ rõ rệt nhất là tiềm năng tạo ra các virus gây nhiễm mới bằng sự tái tổ hợp, ví dụ gen chuyển của virus (viral transgene) liên kết hoặc trao đổi các phần với nucleic acid của các virus khác. Do vỏ protein không ngăn được virus xâm nhập vào tế bào thực vật, gen chuyển (transgene) sẽ được tiếp xúc với các nucleic acid của nhiều virus được mang tới thực vật bởi các vector côn trùng (insect vector).

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các virus thực vật có thể tấn công một loạt các gen virus khác nhau từ cây chuyển gen.

- Virus gây bệnh khảm hoại tử ở cỏ ba lá màu đỏ (red clover necrotic mosaic virus-RCNMV) dạng khiếm khuyết thiếu gen cho phép nó chuyển từ tế bào này đến tế bào khác (vì thế không gây nhiễm được) đã tái tổ hợp với một bản sao của gen đó trong cây thuốc lá chuyển gen *Nicotiana benthamiana*, và đã sinh sản các virus gây nhiễm.

- Cây cải (*Brassica napus*) chuyển gen VI, một nhân tố hoạt động dịch mã, của virus khảm súp- lơ, đã tái tổ hợp với phần bổ sung của virus thiếu mất gen đó, và tạo ra virus gây nhiễm trong 100% cây chuyển gen.

- Thí nghiệm tương tự tiến hành trên cây *N. bigelovii* tạo ra các thể tái tổ hợp gây nhiễm đã mở rộng phạm vi vật chủ của virus.

- Cây *N. benthamiana* biểu hiện một đoạn gen protein vỏ của virus CCMV (cowpea chlorotic mottle virus) đã tái tổ hợp với virus khiếm khuyết không có gen đó. Một công trình nghiên cứu cho thấy có sự tái tổ hợp giữa các gen chuyển virus gây nhiễm trong CCMV, tuy nhiên với tần số cao hơn sự tái tổ hợp giữa các virus gây nhiễm.

- *N. benthamiana* được biến nạp với 3 cấu trúc khác nhau chứa trình tự mã hóa protein vỏ của ACMV (African cassava mosaic virus). Các cây chuyển gen được gây nhiễm với một đột biến khuyết đoạn của protein vỏ của ACMV tạo ra triệu chứng ngấm nhẹ (mild systemic) ở các cây đối chứng. Một số cây bị nhiễm của các dòng chuyển gen đã phát triển các triệu chứng ngấm gay gắt đặc trưng của ACMV. Sự tái tổ hợp đã xuất hiện giữa DNA của virus đột biến và DNA của cấu trúc hợp nhất, kết quả tạo ra các thể hệ virus con tái tổ hợp với các đặc điểm của dạng hoang dại. Khi tất cả các thí nghiệm này đòi hỏi sự tái tổ hợp giữa virus khiếm khuyết và chuyển

gen, nó được nghĩ rằng dưới các điều kiện tự nhiên khi các virus không bị khiếm khuyết, sẽ không có virus tái tổ hợp nào sẽ được sinh ra.

- Sự tái tổ hợp giữa CaMV dạng hoang dại và dạng chuyển gen VI được chứng minh trong *N. bigelovii*. Ít nhất một trong số virus tái tổ hợp có độc tính hơn dạng hoang dại.

Người ta nhận thấy trong các thí nghiệm có CaMV, tần số tái tổ hợp cao hơn nhiều so với các virus khác. Trong khi CCMV tái tổ hợp được phục hồi từ 3% của cây chuyển gen *N. benthamiana* chứa các trình tự CCMV, thì CaMV tái tổ hợp được phục hồi từ 36% của cây chuyển gen *N. bigelovii*. Người ta nghi ngờ rằng sự đứt gãy DNA sợi đôi có thể xảy ra trong trường hợp tái tổ hợp ở CaMV do thực tế là DNA chuyển gen bao gồm cả promoter CaMV 35S.

4.2.4. Phân tích sự tiếp nhận gen chuyển trong thực phẩm

Công nghệ sinh học có vai trò quan trọng đối với sự phát triển trong tương lai của thế giới nhưng thách thức đặt ra là làm thế nào để có nhiều nước đang phát triển tiếp cận được với công nghệ hiện đại. Năm 1994, thực phẩm chuyển gen đầu tiên, cây cà chua mang tính trạng chín chậm, đã được trồng và tiêu thụ ở một số nước phát triển. Từ đó, ngày càng nhiều loại thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen được thương mại hóa và sử dụng trên toàn thế giới. Việc đưa các thực phẩm mới này vào bữa ăn hàng ngày đang làm tăng lên những băn khoăn chính đáng về độ an toàn của chúng.

Các giống cây trồng chuyển gen ngày càng được phát triển nhờ vào các công cụ của công nghệ sinh học hiện đại. Cũng chính vì vậy mà rất nhiều người thắc mắc rằng liệu các thực phẩm này có an toàn bằng các loại thực phẩm có được nhờ sử dụng các biện pháp nông nghiệp truyền thống hay không. Vậy sự khác biệt giữa lai giống thông thường và công nghệ sinh học thực vật là gì.

Thực ra cả hai đều có cùng một mục tiêu là tạo ra các giống cây trồng có chất lượng cao với những đặc tính đã được cải thiện giúp chúng phát triển tốt hơn và ngon hơn. Sự khác biệt là ở chỗ mục đích này đạt được bằng cách nào.

Lai giống truyền thống đòi hỏi sự trao đổi hàng ngàn gen giữa hai cây để có được tính trạng mong muốn. Trong khi đó, nhờ công nghệ sinh học hiện đại, chúng ta có thể lựa chọn một đặc tính mong muốn và chuyển riêng nó vào hạt giống. Sự khác biệt giữa hai kỹ thuật này là rất lớn. Phương pháp công nghệ sinh học hợp lý hơn, có hiệu quả cao và đem lại kết quả rất tốt.

Các kỹ thuật sử dụng trong công nghệ sinh học hiện đại cung cấp cho những nhà lai tạo giống những công cụ chính xác cho phép họ chuyển những đặc tính mong muốn vào cây trồng. Hơn thế nữa, họ có thể làm điều này mà không bị chuyển thêm các tính trạng không mong muốn vào cây như vẫn thường xảy ra nếu sử dụng lai giống truyền thống. Công nghệ sinh học thực vật tạo điều kiện cho các nhà khoa học có thể kiểm soát được các gen chuyển, nhờ vậy có thể nghiên cứu rất chi tiết các tính trạng đưa vào.

Thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen phải trải qua nhiều thử nghiệm hơn bất kỳ loại thực phẩm nào trong lịch sử. Trước khi được đưa ra thị trường, chúng phải được đánh giá sao cho phù hợp với các quy định do một vài tổ chức khoa học quốc tế đưa ra như Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), Tổ chức Nông Lương (FAO), Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD)... Những quy định này như sau:

- Các sản phẩm chuyển gen cần được đánh giá giống như các loại thực phẩm khác. Các nguy cơ gây ra do thực phẩm có nguồn gốc từ công nghệ sinh học cũng có bản chất giống như các loại thực phẩm thông thường.

- Các sản phẩm này sẽ được xem xét dựa trên độ an toàn, khả năng gây dị ứng, độc tính và dinh dưỡng của chúng hơn là dựa vào phương pháp và kỹ thuật sản xuất.

- Bất kỳ một chất mới nào được đưa thêm vào thực phẩm thông qua công nghệ sinh học đều phải được cho phép trước khi đưa ra thị trường cũng như việc các loại chất phụ gia mới như chất bảo quản hay màu thực phẩm cần phải được cho phép trước khi thương mại hóa.

Một số nhận định trong vấn đề an toàn thực phẩm, như sau:

- Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với các thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với việc đánh giá các thực phẩm khác. Quá trình đánh giá an toàn thực phẩm đảm bảo rằng thực phẩm chuyển gen mang lại tất cả các lợi ích như thực phẩm thông thường và không có thêm một tác hại nào.

- Chưa có bằng chứng nào cho thấy thực phẩm chuyển gen hiện đang có trên thị trường gây ra bất cứ lo ngại nào về sức khỏe con người hay có bất kỳ khía cạnh nào kém an toàn hơn so với cây trồng tạo được nhờ lai giống truyền thống.

- Một điểm đặc trưng của kỹ thuật chuyển gen là nó đưa vào một hay nhiều gen đã được xác định rõ. Điều này giúp cho việc thử nghiệm độc tính của các cây trồng chuyển gen dễ thực hiện hơn so với các cây trồng bình thường.

+ Các chất gây dị ứng

Một trong những mối quan tâm lớn nhất về thực phẩm chuyển gen là chất gây dị ứng (một protein gây ra phản ứng dị ứng) có thể được chuyển vào thực phẩm. May mắn là các nhà khoa học đã biết rất nhiều về các thực phẩm gây ra dị ứng ở trẻ nhỏ và người trưởng thành. Khoảng 90% sự dị ứng thức ăn là có liên quan tới tám thực phẩm và nhóm thực phẩm-động vật có vỏ (tôm, cua, sò, hên), trứng, cá, sữa, lạc, đậu tương, quả hạch và lúa mì. Những loại thực phẩm này và rất nhiều chất gây dị ứng khác đã được xác định rất rõ và do vậy khó tin rằng chúng có thể được đưa vào thực phẩm chuyển gen.

Tuy vậy, việc kiểm tra tính dị ứng vẫn là một khâu quan trọng trong việc kiểm tra an toàn trước khi một giống cây trồng được đưa ra làm thực phẩm. Hàng loạt các thử nghiệm và câu hỏi phải được xem xét kỹ để quyết định liệu thực phẩm này có làm tăng sự dị ứng hay không.

Các chất gây dị ứng có những đặc tính chung như: chúng không bị phân hủy trong quá trình tiêu hóa, chúng có xu hướng không bị phân hủy trong quá trình chế biến thực phẩm, và chúng thường có rất nhiều trong thực phẩm. Không có bất kỳ protein nào được chuyển vào thực phẩm chuyển gen đã được thương mại hóa lại mang những đặc tính này. Chúng phải không có tiền sử và khả năng gây dị ứng hay độc tính, chúng không giống với các chất gây dị ứng hay các độc tố đã biết và chức năng của chúng đã được biết rõ. Chúng cũng có một hàm lượng rất thấp trong thực phẩm chuyển gen, sẽ nhanh chóng bị phân hủy trong dạ dày và được kiểm tra lại xem có an toàn không trong các nghiên cứu về thực phẩm cho động vật.

Các gen mã hóa thông tin di truyền có mặt trong tất cả các loại thực phẩm và việc ăn chúng không gây ra bất kỳ ảnh hưởng xấu nào. Không có

tác hại di truyền nào xảy ra khi tiêu hóa DNA cả. Trên thực tế, chúng ta luôn nhận DNA mỗi khi ăn do nó có mặt ở tất cả thực vật và động vật.

+ Đánh giá độ an toàn của các thực phẩm

Bất kỳ một sản phẩm chuyển gen nào trước khi đưa ra thị trường phải được thử nghiệm toàn diện, được các nhà khoa học và các giám định viên đánh giá độc lập xem có an toàn hay không về dinh dưỡng, độc tính, khả năng gây dị ứng và các khía cạnh của khoa học thực phẩm này đều dựa trên những quy định của các tổ chức có thẩm quyền của mỗi nước. Chúng bao gồm: một hướng dẫn sản phẩm, thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hóa sinh, độc tính, dinh dưỡng và khả năng gây dị ứng. Các câu hỏi điển hình có thể được đặt ra là: (1) Các thực phẩm chuyển gen có được tạo ra từ thực phẩm truyền thống đã được công nhận an toàn hay không. (2) Nồng độ các độc tố hay chất gây dị ứng trong thực phẩm có thay đổi hay không. (3) Hàm lượng các chất dinh dưỡng chính có thay đổi hay không. (4) Các chất mới trong thực phẩm chuyển gen có đảm bảo tính an toàn hay không. (5) Khả năng tiêu hóa thức ăn có bị thay đổi hay không. (6) Các thực phẩm có được tạo ra nhờ các quy trình đã được chấp nhận hay không.

Ngay khi các câu hỏi này và các câu hỏi khác về thực phẩm chuyển gen đã được trả lời, vẫn còn nhiều việc phải làm trong quá trình phê chuẩn trước khi thực phẩm chuyển gen được thương mại hóa. Thực tế, thực phẩm chuyển gen là loại sản phẩm được nghiên cứu nhiều nhất trong các loại đã được sản xuất.

+ Gen kháng kháng sinh

Một vài giống cây trồng chuyển gen có chứa các gen quy định tính trạng kháng kháng sinh. Các nhà khoa học sử dụng tính trạng này như một chỉ thị (marker) để nhận biết ra những tế bào đã chuyển được gen vào. Ngày càng có nhiều lo lắng rằng các gen chỉ thị này có thể được phát tán từ các cây trồng chuyển gen sang các vi sinh vật cư trú trong ruột người và chúng làm tăng khả năng đề kháng đối với kháng sinh. Đã có rất nhiều các nghiên cứu và thử nghiệm khoa học về vấn đề này để đi tới các kết luận sau:

Khả năng các gen kháng kháng sinh có thể được phát tán từ các cây trồng chuyển gen sang các sinh vật khác là vô cùng thấp; và thậm chí khi sự kiện ít xảy ra là một gen kháng sinh được phát tán sang một sinh vật khác thì tác động của việc này cũng không đáng kể do các chỉ thị được sử dụng trong cây trồng chuyển gen có ứng dụng trong thú y và y học rất hạn chế

Tuy nhiên, để làm dịu những lo lắng của xã hội, các nhà nghiên cứu được yêu cầu tránh sử dụng các gen kháng kháng sinh trong cây trồng chuyển gen. Việc sử dụng các chỉ thị thay thế khác đang được đánh giá và phát triển.

4.3. Nguy cơ đối với môi trường và hệ sinh thái

Mặc dù “thế hệ thứ nhất” của các giống cây trồng công nghệ sinh học tập trung vào việc đem lại những lợi ích kinh tế đáng kể cho người nông dân, song ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy công nghệ sinh học còn mang lại những lợi ích lớn hơn về an toàn lương thực và môi trường.

Những kết quả sử dụng công nghệ sinh học tại Mỹ cho thấy, việc sử dụng thuốc trừ sâu đã giảm đáng kể, môi trường vẫn được bảo đảm trong khi sản lượng vẫn tăng và tiết kiệm chi phí sản xuất. Mặc dù kết quả sử dụng công nghệ sinh học đối với từng vùng có khác nhau nhưng những lợi ích kinh tế do nó mang lại rất rõ ràng, không chỉ đối với người sử dụng mà còn đối với cả môi trường và người tiêu dùng. Các lợi ích như giống cây lai bằng công nghệ sinh học ít phụ thuộc hóa chất đầu vào, do đó nguy cơ gây ô nhiễm nguồn nước thấp hơn; việc hạn chế sử dụng hóa chất sẽ tăng độ an toàn của nước, đảm bảo môi trường tốt hơn cho sinh vật trong tự nhiên; các vụ mùa ứng dụng công nghệ sinh học cho năng suất cao hơn.

Tuy nhiên, những cuộc tranh luận xung quanh ảnh hưởng của cây chuyển gen đối với môi trường ngày càng phức tạp. Vấn đề này càng phức tạp hơn khi có các nghiên cứu mới được công bố. Như vậy cây chuyển gen có an toàn với môi trường hay không.

Việc đánh giá ảnh hưởng của cây chuyển gen tới môi trường thường rất khó khăn do phải xem xét nhiều yếu tố. Một số nhà khoa học tập trung vào nguy cơ tiềm tàng của cây chuyển gen trong khi số khác lại nhấn mạnh triển vọng về lợi nhuận.

4.3.1. Thực trạng môi trường hiện nay ra sao

Dân số gia tăng, trái đất ngày càng nóng lên và đa dạng sinh học (biodiversity) mất dần đang ảnh hưởng rất nghiêm trọng đến môi trường.

Sự phá hủy rừng và môi trường tự nhiên, sử dụng ngày càng nhiều than đá dẫn tới sự gia tăng không ngừng lượng khí CO làm trái đất nóng lên. Người ta dự đoán rằng nhiệt độ trung bình của trái đất sẽ tăng từ 2-3°C tính đến năm 2100, đồng thời với sự biến động của thời tiết. Sự thay đổi khí hậu có thể làm thay đổi căn bản chế độ mưa, do đó gây nên sự di cư của con người và những biến đổi trong các hoạt động nông nghiệp.

Thêm vào đó dân số gia tăng (theo dự đoán đến năm 2020, dân số thế giới sẽ lên tới 8 tỷ người) dẫn đến phá hủy tự nhiên, giảm chất lượng nước và thay đổi dòng chảy. Sinh cảnh (biotope) bị mất làm cho nhiều loài đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng.

Bởi vậy, để bảo tồn rừng, sinh cảnh và sự đa dạng sinh học, chúng ta cần phải đảm bảo nhu cầu lương thực trong tương lai dựa trên quỹ đất hiện có.

4.3.2. Những lợi ích của cây chuyển gen

Cây chuyển gen có lợi ích tiềm tàng đối với môi trường. Chúng giúp bảo tồn các nguồn lợi tự nhiên, sinh cảnh và động-thực vật bản địa. Thêm vào đó, chúng góp phần giảm xói mòn đất, cải thiện chất lượng nước, cải thiện rừng và nơi cư ngụ của động vật hoang dại.

Thực vật với khả năng tự bảo vệ chống lại côn trùng và cỏ dại có thể giúp giảm liều lượng và nồng độ của các thuốc trừ sâu sử dụng. Ví dụ: ở Trung Quốc, bông Bt đã giúp giảm lượng thuốc diệt côn trùng xuống còn 40 kg/ha.

Giảm sử dụng thuốc trừ sâu đã cải thiện đáng kể chất lượng nước ở những vùng sử dụng thuốc. Ví dụ: nước chảy qua các cánh đồng bông Bt ở Mỹ hoàn toàn không còn nhiễm thuốc trừ sâu trong suốt 4 năm nghiên cứu của Bộ Nông nghiệp Mỹ.

Thực vật kháng thuốc diệt cỏ giúp cho việc sử dụng biện pháp không cày đất (yếu tố quan trọng trong việc bảo tồn đất đai) trở nên phổ biến. Ví dụ: người trồng cải dầu chuyển gen ở Canada đã ít phải cày cấy hơn so với khi trồng cây cải dầu truyền thống.

Cây chuyển gen có thể tăng đáng kể sản lượng thu hoạch, do vậy với diện tích đất canh tác ít hơn vẫn có thể thu được nhiều lương thực hơn. Ví dụ: Ở Mỹ, vào năm 1999 đã có 66 triệu ruộng ngô tránh được sâu đục thân.

4.3.3. Đánh giá cây chuyển gen đối với an toàn môi trường

Các cây chuyển gen được đánh giá cẩn thận về ảnh hưởng tới môi trường trước khi đưa ra thị trường tuân theo các quy tắc do các tổ chức và các chuyên gia môi trường trên khắp thế giới xây dựng. Chẳng hạn, Hội đồng nghiên cứu quốc gia Mỹ năm (1989), Tổ chức hợp tác phát triển kinh tế năm (1992), chính phủ Canada năm (1994)... Những người đánh giá ảnh hưởng của cây chuyển gen bao gồm những người tạo ra chúng, các cơ quan kiểm soát và các nhà khoa học khác.

Hầu hết các quốc gia sử dụng các quy trình đánh giá tương tự nhau để xem xét sự tương tác giữa cây chuyển gen và môi trường. Bao gồm những thông tin về vai trò của gen được đưa vào, ảnh hưởng của nó đối với cây nhận gen, đồng thời cả những câu hỏi cụ thể về các ảnh hưởng không mong muốn như:

- Ảnh hưởng lên các sinh vật không phải là sinh vật cần diệt trong môi trường đó.
- Cây chuyển gen có tồn tại trong môi trường lâu hơn bình thường hoặc xâm chiếm những nơi cư ngụ mới không.
- Khả năng gen phát tán ngoài ý muốn từ cây chuyển gen sang loài khác và những hậu quả có thể xảy ra.

4.3.4. Những rủi ro có thể của cây chuyển gen

Khả năng xảy ra lai chéo xa của gen được chuyển vào cây trồng với các cây cỏ họ hàng, cũng như khả năng tạo ra những loại cỏ mới.

Lai chéo xa là lai không mong muốn giữa cây trồng với một cây có quan hệ họ hàng. Lo ngại chính về ảnh hưởng của cây chuyển gen đối với môi trường là khả năng tạo ra loài cỏ mới thông qua lai chéo xa với các cây họ hàng hoang dại hoặc đơn giản hơn là tồn tại lâu trong tự nhiên.

Khả năng trên có thể xảy ra, được đánh giá trước quá trình chuyển gen và được kiểm soát sau khi đưa cây ra trồng. Một nghiên cứu bắt đầu từ năm 1990 kéo dài 10 năm đã chứng minh rằng thực vật chuyển gen (như cải dầu,

khoai tây, ngô, củ cải đường...) không làm tăng nguy cơ xâm chiếm hay tồn tại lâu dài trong môi trường tự nhiên so với các cây không chuyển gen tương ứng. Các tính trạng như chống chịu thuốc diệt cỏ, kháng côn trùng cũng đã được điều tra đồng thời với những cây không chuyển gen tương ứng (Crawley và cs 2001).

Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu cho rằng những kết quả này không có nghĩa là sự thay đổi di truyền không thể làm gia tăng tính hoang dại hay khả năng phát tán của cây trồng mà chúng chỉ ra rằng những cây trồng năng suất cao khó có thể tồn tại lâu dài nếu không được canh tác. Do đó, việc đánh giá cây chuyển gen theo từng trường hợp như đã quy định là rất quan trọng.

4.3.5. Ảnh hưởng của cây chuyển gen trực tiếp lên các sinh vật không phải là sinh vật cần diệt

Tháng 5 năm 1999, xuất hiện báo cáo rằng hạt phấn từ cây ngô Bt có ảnh hưởng bất lợi đối với ấu trùng bướm Monarch. Báo cáo này gây ra những lo lắng về nguy cơ tiềm tàng đối với bướm Monarch và có thể đối với những sinh vật không phải là sinh vật cần diệt khác. Một số nhà khoa học lại cho là cần phải thận trọng trong việc giải thích những kết quả nghiên cứu vì nghiên cứu phản ánh một tình huống khác với thực trạng môi trường.

Báo cáo cho thấy nghiên cứu này được tiến hành trong phòng thí nghiệm và có thể là khởi đầu của những vấn đề quan trọng, tuy nhiên nếu chỉ dựa vào nó thì không đủ cơ sở để rút ra kết luận về nguy cơ đối với quần thể bướm Monarch trên cánh đồng.

Một báo cáo khác của Ủy ban bảo vệ môi trường Mỹ chỉ ra rằng các số liệu nghiên cứu đã chứng minh protein trong cây trồng không có ảnh hưởng bất lợi đối với sinh vật không phải là sinh vật cần diệt. Thêm vào đó, một nghiên cứu của trường Đại học Illinois (Mỹ) cũng cho thấy bướm Monarch không bị gây hại bởi hạt phấn Bt trong điều kiện đồng ruộng thực sự.

Nhìn chung, những mối quan tâm tới sinh thái và môi trường xuất phát từ cây chuyển gen được đánh giá trước khi thương mại hóa chúng. Đồng thời cần có sự kiểm soát các hệ thống nông nghiệp tốt để phát hiện và giảm thiểu những mối nguy hại có thể xảy ra. Chúng ta cần so sánh các phương pháp chuyển gen hiện đại và truyền thống để làm sáng tỏ những

môi rủi ro tương đối cũng như những lợi ích của việc áp dụng cây chuyển gen.

4.4. Nguy cơ đối với con người

4.4.1. Quản lý chặt sản phẩm biến đổi gen

Mọi hoạt động có liên quan đến các loại sản phẩm này như xuất nhập khẩu, vận chuyển và sử dụng, nghiên cứu khoa học, khảo nghiệm và chuyển giao kết quả nghiên cứu... đều phải nằm dưới sự quản lý của chính quyền để quản lý an toàn các sinh vật đã biến đổi gen và sản phẩm của chúng, đảm bảo tuân thủ nghiêm ngặt các biện pháp quản lý rủi ro.

Các tổ chức và cá nhân thực hiện các hoạt động trên nếu vi phạm quy chế, gây thiệt hại cho sản xuất, cho môi trường và sức khỏe con người sẽ phải bồi thường mọi thiệt hại và chi phí khắc phục hậu quả. Trường hợp nghiêm trọng có thể bị truy cứu trước pháp luật.

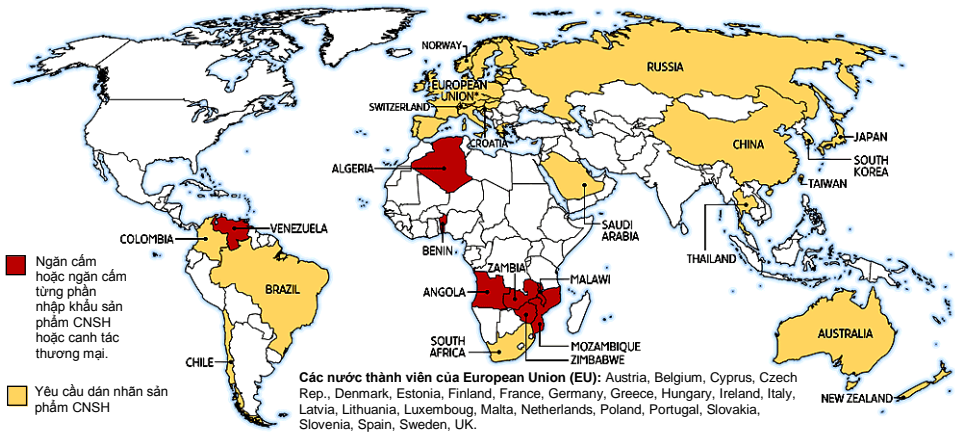
Các chuyên gia cho rằng, bên cạnh ưu điểm về năng suất, chất lượng, khả năng chống chịu sâu bệnh và thời tiết khắc nghiệt, các sinh vật chuyển gen cũng là mối nguy cơ gây mất an toàn sinh học. Một số gen như gen kháng thuốc hay gen mang cơ chế "kết thúc" (terminator) nảy mầm khuếch tán vào môi trường có thể dẫn tới tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn gây bệnh và mất khả năng nảy mầm ở nhiều loại cây trồng. Bên cạnh đó, sản phẩm biến đổi gen cũng có thể gây dị ứng cho người tiêu dùng.

4.4.2. Nguy hiểm cho sức khỏe con người

Không có các vấn đề quan trọng nổi bật về sức khỏe của con người liên quan đến các cây trồng thực phẩm được biến đổi di truyền (được tiêu thụ nhiều tại Mỹ). Tuy nhiên, do các thực phẩm biến đổi gen không được đánh dấu, người dân có thể chịu một hậu quả xấu liên quan đến việc họ tiêu dùng loại thực phẩm này.

Điều quan trọng cần nhớ là trong 3-4 năm vừa qua, các cây đậu tương và ngô kháng côn trùng và thuốc diệt cỏ đã được trồng hàng triệu acre² ở Mỹ và được sử dụng tiếp trong chế biến thực phẩm.

² 1 acre tương đương 0,4 hectare (ha).



Hình 4.6. Bản đồ các nước ngăn cấm hoặc yêu cầu dán nhãn trên các thực phẩm công nghệ sinh học (CNSH). Liên minh châu Âu (European Union, EU) đã cam kết theo một tiêu chuẩn quy định cho dán nhãn thực phẩm công nghệ sinh học, nhưng gần đây một số nước thành viên đã không thể thực hiện được nữa.

Hơn một thập kỷ qua, các chuyên gia an toàn thực phẩm đã xác nhận một số vấn đề tiềm tàng có thể tăng lên như là một kết quả của các cây trồng thực phẩm chuyển gen, bao gồm các khả năng đưa các độc tố mới hoặc các chất gây dị ứng vào trong các thực phẩm an toàn trước đây, làm tăng độc tính với các mức độ nguy hiểm trong thực phẩm, mà trước đây được sản xuất bởi một số chất không độc, hoặc làm giảm bớt giá trị dinh dưỡng của thực phẩm.

Trong số các tác động tiềm tàng này, các nhà khoa học và các giám định viên lo lắng nhất là về các chất gây dị ứng mới, và thực vậy, hai sự kiện trong thập kỷ vừa qua phù hợp với điều đó:

- Đầu tiên, một bài báo công bố trong tờ *New England Journal of Medicine (NEJM)* vào năm 1996 xác nhận dự báo công nghệ di truyền có thể chuyển một chất gây dị ứng từ một thực phẩm gây dị ứng đã biết vào một thực phẩm khác (Nordlee và cs 1996). Một vài năm trước đó, các nhà khoa học ở Pioneer Hi-Bred Seed Company đã chuyển thành công một gen từ cây dẻ Brazil (Brazil nut) vào trong đậu nành để cải thiện chất lượng dinh dưỡng của cây trồng bằng hạt. Các thí nghiệm tiếp theo cho thấy những

người dị ứng với hạt dẻ Brazil cũng dị ứng tương tự với cây đậu nành chuyển gen.

- Thứ hai, trong những năm cuối thập niên 1990, người ta đã thông báo rằng một dạng biến dị của ngô Bt (StarLink) chứa một tác nhân gây dị ứng tiềm tàng được đưa vào thực phẩm một cách bất hợp pháp làm nổi lên một làn sóng tranh luận về điều đó, cuối cùng đã giảm xuất khẩu ngô, gây hoang mang cho ngành công nghiệp thực phẩm, tạo ra sự nghi ngờ rộng lớn về cơ cấu tổ chức giám định của Mỹ. Cục Bảo vệ Môi trường (EPA) không chấp thuận sử dụng ngô StarLink làm thực phẩm cho người vì lo ngại độc tố Bt có thể gây ra các phản ứng dị ứng trong người tiêu dùng. Năm 1998, cơ quan này đã đồng ý cho phép sử dụng StarLink dùng làm thức ăn gia súc. Hai năm sau, một liên minh của các nhóm có chung lợi ích công cộng đã kiểm tra các sản phẩm trên các quầy thực phẩm bán lẻ và đã tìm thấy ngô StarLink trong vỏ của món bánh thịt chiên giòn (taco shell). Sau đó, ngô chuyển gen không được chấp thuận này lại được tìm thấy trong nhiều sản phẩm khác. Người ta bắt buộc phải thu hồi lại nó và đóng cửa nhà máy, ngừng xuất khẩu, và mua lại ngô đã bị nhiễm bẩn. Sự cố StarLink minh họa rõ ràng sự yếu kém của hệ thống giám định của Mỹ trong khu vực hậu thương mại hóa, tiếp tục ám ảnh nông dân Mỹ, các nhà chế biến thực phẩm, và các công ty công nghệ sinh học.

Câu hỏi

1. Những lợi ích của cây trồng chuyển gen?
2. Các nghiên cứu về an toàn của cây trồng chuyển gen?
3. Thách thức hiện nay của cây trồng chuyển gen?

MỤC LỤC

Lời nói đầu

Chương 1. Sản xuất, xác nhận và độ bền vững của cây trồng chuyển gen	1
1.1. Các phương pháp chuyển gen	1
1.1.1. Chuyển gen nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2
1.1.2. Chuyển gen bằng phương pháp phi sinh học	10
1.1.3. Chuyển gen bằng tế bào trần	14
1.2. Hệ thống chọn lọc và chi thị	15
1.3. Tái sinh cây hoàn chỉnh	18
1.4. Xác nhận sự thay đổi gen	19
1.5. Biểu hiện của DNA ngoại lai	23
1.5.1. Biểu hiện gen ngoại lai ở nhiều vị trí	24
1.5.2. Biểu hiện gen ở tế bào hoặc mô đặc hiệu	24
1.5.3. Biểu hiện antisense	25
1.5.4. Sự bền vững của cây chuyển gen	27
1.5.5. Sự bất hoạt do methyl hoá	28
1.5.6. Đồng ức chế	28
Chương 2. Những đặc tính mới của cây chuyển gen	30
2.1. Tăng tính kháng và thích nghi với môi trường	32
2.1.1. Kháng thuốc diệt cỏ	32
2.1.2. Kháng côn trùng gây hại	37
2.1.3. Kháng virus gây bệnh	40
2.1.4. Kháng vi khuẩn và nấm	43
2.1.5. Kháng các điều kiện ngoại cảnh bất lợi	45
2.2. Nâng cao chất lượng sản phẩm	47
2.2.1. Carbohydrate và acid béo	47
2.2.2. Hàm lượng protein và amino acid không thay thế	50
2.2.3. Vitamin, chất khoáng và các nguyên tố vi lượng	51
2.2.4. Tăng khả năng bảo quản và hương vị	54
2.2.5. Giảm các chất gây dị ứng	55

2.2.6.	Vaccine thực phẩm	55
2.3.	Những ứng dụng mới của cây trồng-nguồn nguyên liệu và cải tạo đất	56
2.3.1.	Carbohydrate và acid béo là nguồn nguyên liệu	57
2.3.2.	Chất tổng hợp	57
2.3.3.	Protein thực vật	58
2.3.4.	Cải tạo đất	58
2.4.	Cây dược liệu	59
2.4.1.	Alkaloid	59
2.4.2.	Chất miễn dịch	61
2.5.	Thực vật biến đổi gen	62
2.5.1.	Thay đổi màu hoa	62
2.5.2.	Thay đổi hình dạng hoa	66
2.6.	Bất dục đực nhân tạo để sản xuất hạt lai	68
Chương 3. Công nghệ chuyển gen ở động vật		71
3.1.	Công nghệ gen trong tạo giống động vật mới	71
3.1.1.	Tạo giống vật nuôi có tốc độ lớn nhanh, hiệu quả sử dụng thức ăn cao	74
3.1.2.	Tạo giống vật nuôi chuyên sản xuất protein quý dùng trong y dược	75
3.1.3.	Tạo giống vật nuôi kháng bệnh và sự thay đổi của điều kiện môi trường	79
3.1.4.	Tạo giống vật nuôi có năng suất và chất lượng cao bằng cách thay đổi các con đường chuyển hóa trong cơ thể động vật	80
3.2.	Công nghệ sinh sản	81
3.2.1.	Siêu bài noãn	81
3.2.2.	Thụ tinh nhân tạo	81
3.2.3.	Cấy chuyển phôi và các công nghệ liên quan	85
3.2.4.	Tạo dòng vô tính động vật	89
3.3.	Sản xuất vaccine thú y	94
3.4.	Sản xuất kháng thể đơn dòng	9
3.5.	Sản xuất protein đơn bào	98

3.6.	Sản xuất hormone sinh trưởng	100
Chương 4.	Những lợi ích và thách thức của cây trồng chuyển gen	102
4.1.	Sử dụng cây trồng chuyển gen	104
4.2.	Các nghiên cứu về sự an toàn của cây chuyển gen	109
4.2.1.	Xác nhận sự chuyển gen bằng hạt phấn	109
4.2.2.	Nghiên cứu sự bền vững của DNA trong đất	115
4.2.3.	Nghiên cứu sự chuyển gen từ thực vật vào vi sinh vật	116
4.2.4.	Phân tích sự tiếp nhận gen chuyển trong thực phẩm	120
4.3.	Nguy cơ đối với môi trường và hệ sinh thái	124
4.3.1.	Thực trạng môi trường hiện nay ra sao	125
4.3.2.	Những lợi ích của cây chuyển gen	125
4.3.3.	Đánh giá cây chuyển gen đối với an toàn môi trường	126
4.3.4.	Những rủi ro có thể của cây chuyển gen	126
4.3.5.	Ảnh hưởng của cây chuyển gen trực tiếp lên các sinh vật không phải là sinh vật cần diệt	127
4.4.	Nguy cơ đối với con người	128
4.4.1.	Quản lý chặt sản phẩm biến đổi gen	128
4.4.2.	Nguy hiểm cho sức khỏe con người	128

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trần Quốc Dung. 2001. Nghiên cứu chuyển gen hormone sinh trưởng người vào cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) bằng phương pháp vi tiêm. *Luận án Tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện khoa học công nghệ Việt Nam, Hà Nội.*

Nguyễn Mộng Hùng. 2004. Công nghệ tế bào phôi động vật. *NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.*

Đặng Hữu Lanh, Trần Đình Miên và Trần Đình Trọng. 1999. Cơ sở di truyền chọn giống động vật. *NXB Giáo dục, Hà Nội.*

Bains W. 2003. *Biotechnology from A to Z. Oxford University Press, Inc. New York, USA.*

Chopra VL and Nasim A. 1990. *Genetic Engineering and Biotechnology, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.*

Dingermann T. 1999. *Gentechnik Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutsch.*

Glick BR and Pasternak JJ. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and applications of Recombinant DNA. 3rd Edition. ASM Press, USA.*

Birch RG. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical applications. *Annual Review of plant physiology plant Molecular Biology* 48:297-326.

Chrispleels MJ and Sadava DE. 2003. *Plants, Genes, and Crop Biotechnology. 2nd Edition. Jones and Bartlett publishers, Massachusetts, USA.*

Eastham K and Sweet J. 2002. *Gentetically Modified Organisms (GMOS): The Significance of Gene Flow through Pollen Trasfes. European Enviroment Agency (EEA), Copenhagen, Denmark.*

Kempken F and Kempken R. 2000. *Gentechnik bei Pflanzen, Springer, Deutsch.*

Houdebine LM. 2003. *Animal Trasgenenesis and Cloning. John Willey and Sons, Ltd. USA.*

National Research Council. 2002. *Animal Biotechnology, Printed in the USA.*

Nordlee J, Taylor S, Townsend J, Thomas L and Bush R. 1996. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybean. *New Enland Journal of Medicine* 334: 688-692.

Ratledge C and Kristiansen B. 2002. *Basic Biotechnology. Cambridge University Press, UK.*

Raven PH and Johnson GB. 1996. *Biology, 4th Edition. Wm. C. Brown publishers, Dubuque, IA.*

Walker JM and Rapley R. 2002. *Molecular Biology and Biotechnology. 4th Edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.*

<http://www.biotechvn.com>

<http://binas.unido.org>. BINAS Online: The environmental risks of transgenic crops: an agroecological assessment.

<http://www.ucsusa.org>. Special Feature: Environmental effects of genetically modified food crops.

<http://www2.dupont.com>. Dupont Biotechnology: Horizontal gene transfer and transgenic crops.

<http://www.ffc.agnet.org/library/article/tb15a.html>. Technical aspects of the recovery, handling and transfer of embryos.