

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

BÙI THỊ LAN HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN KHÁNG BỆNH NẤM
VÀO MỘT SỐ GIỐNG CÀ CHUA THÔNG QUA VI KHUẨN
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

**Chuyên ngành: Di truyền và chọn giống cây trồng
Mã số : 62 62 05 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

**Người hướng dẫn : PGS. TS. Lê Thị ánh Hồng
PGS.TS. Nguyễn Hồng Minh**

HÀ NỘI - 2010

Công trình hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Thị ánh Hồng

2 PGS.TS. Nguyễn Hồng Minh

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Huệ

Trung tâm Tài nguyên thực vật

Phản biện 2: TS. Đặng Trọng Lương

Viện Di truyền nông nghiệp

Phản biện 3: PGS.TS. Ngô Bích Hảo

Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Luận án đã được bảo vệ tại hội đồng chấm luận án cấp Trường họp tại:

Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Vào hồi 8h30', ngày 23 tháng 11 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill) là cây trồng được nhập nội vào nước ta hơn 100 năm trước. Hiện nay, bằng con đường nhập nội giống, chúng ta còn thu thập được một tập đoàn gen khoảng 1000 mẫu giống cà chua khác nhau tập trung ở các Viện Nghiên cứu, các trường Đại học, các tỉnh. Nước ta do điều kiện thời tiết nóng ẩm, mưa nhiều là những điều kiện thuận lợi cho nhiều loại bệnh phát sinh gây hại cho Cà Chua cả trong điều kiện vườn ươm và ngoài đồng ruộng. Các loại bệnh hại này không chỉ ảnh hưởng lên năng suất mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng lên chất lượng quả, giảm khả năng thương phẩm. Vì thế hàng năm những người sản xuất cà chua đã phải sử dụng một lượng thuốc BVTV rất lớn để bảo vệ năng suất và chất lượng quả của mình, làm ô nhiễm môi trường. Những giống cà chua có khả năng kháng được nhiều loại bệnh khác nhau sẽ giúp rất nhiều cho ngành sản xuất cà chua nói chung, đây là vấn đề có ý nghĩa lớn trong nông nghiệp.

Chuyển gen là một công cụ hiệu quả bổ sung cho chọn tạo giống truyền thống và có thể giúp cho việc mở rộng các nguồn gen có lợi sang các giống khác. Công nghệ chuyển gen cũng cung cấp lợi thế trong việc chuyển một gen đơn hoặc thậm chí các gen số lượng, tránh được những khó khăn mà phương pháp chọn tạo giống truyền thống phải đương đầu.

Cho đến nay các nhà khoa học đã chuyển thành công một số gen vào cà chua nhằm tạo ra những giống cà chua có năng suất và chất lượng cao. Các vector đã được cải tiến, sửa chữa có tiềm năng to lớn tiếp tục bổ sung cho phương pháp chuyển gen qua *Agrobacterium*. Frary và Earle (1996).

Chính vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài: “*Nghiên cứu chuyển gen kháng bệnh nấm vào một số giống cà chua thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens*”

2 Mục tiêu của đề tài

Xác định các môi trường nuôi cấy, tái sinh cây, thiết lập hệ thống biến nạp các gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* nhằm thu nhận các cây tái sinh mang các gen chuyển ở một số giống cà chua.

3 Nội dung của đề tài

Nội dung nghiên cứu

Nội dung I: Xác định các môi trường nuôi cấy *in vitro* thu cây cà chua tái sinh để

phục vụ cho chuyển nạp gen.

1.1. Kiểm tra tình trạng sạch bệnh của các vật liệu của cà chua trước khi đưa vào nuôi cấy mô *in vitro* bằng kỹ thuật ELISA tại Việt Nam.

1.2. Xác định các môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo tối ưu từ các mẫu cấy khác nhau (lá mầm, trụ lá mầm và lá thật còn non) của một số dòng, giống cà chua thí nghiệm.

1.3. Nghiên cứu một số yếu tố cho khả năng cao nhất tái sinh cây *in vitro* từ các mẫu cấy khác nhau (lá mầm, trụ lá mầm và lá thật còn non) của một số dòng, giống cà chua. Đây là những nghiên cứu làm cơ sở cho những thành công của biến nạp gen tiếp theo.

Nội dung 2: Nghiên cứu chuyển gen kháng nấm Glucanase- Osmotin vào giống cà chua Balan, H18 và dòng đại *L.pennelli*.

Nội dung 3: Nghiên cứu chuyển gen Defencin kháng nấm vào cà chua H18 và dòng đại *L.pennelli*.

Nội dung 4: Nghiên cứu chuyển gen Chitinase vào cà chua P375 và giống Pháp lùn.

4 Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

- Đã xác định được các điều kiện và qui trình tái sinh cây cà chua *in vitro* ứng dụng cho chuyển nạp gen và các mục tiêu nghiên cứu khác.
- Đã góp phần xác định được hiệu quả sử dụng 2 vector đúp hữu ích (Vector mang gen *Chitinas-Glucanas* và vector mang gen *Glucanase- Osmotin*) trong chuyển nạp gen vào một số giống cà chua nghiên cứu.
- Đây là những tài liệu có hàm lượng khoa học tốt về công nghệ nuôi cấy *in vitro*, chuyển nạp gen ở cà chua. Chúng có giá trị tham khảo trong nghiên cứu công nghệ sinh học nông nghiệp ứng dụng và trong công tác giảng dạy ở các trường đại học.

5 Những đóng góp mới của luận án

5.1. Luận án đã xác định được các môi trường nuôi cấy nhằm thu nhận cây cà chua tái sinh đối với các giống P 375, H18, Ba lan và giống Pháp lùn, đặc biệt đối với các loài cà chua đại *L. pennelli*

5.2. Lần đầu tiên ở Việt nam đã thực hiện thành công các quy trình chuyển gen kháng nấm *Chitinas-Glucanas* và *Glucanase-Osmotin* thông qua vi khuẩn *Agrobacterrium tumefaciens* vào một số dòng, giống cà chua như P375 và H18 để tạo giống kháng nấm.

5.3. Đã tạo được một số dòng cà chua kháng nấm mang gen kháng nấm như *Defensin* (giống H18), Chitinase (giống P375), Glucanase (giống Balan). Sự có mặt của gen chuyển đã được kiểm tra bằng các phương pháp định tính (sinh học) và phân tử.

6 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.

6.1. Đối tượng nghiên cứu:

-Đề tài đã sử dụng 2 chủng vi khuẩn :

+Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens* EHA 105

+ Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens* LBA4404

-Các giống cà chua: +Ba lan, Pháp lùn, P375 , H18 và dòng cà chua dại L. Pennelli

6.2. Phạm vi nghiên cứu:

- Nghiên cứu đưa ra các môi trường tạo callus và tái sinh cây có hiệu quả phục vụ cho thí nghiệm chuyển nạp gen.

- Thực hiện các qui trình chuyển nạp gen nhằm thu được các cây cà chua tái sinh mang gen chuyển và thẩm định sự có mặt của chúng bằng phương pháp chỉ thị phân tử.

6.3. Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm của Phòng Bệnh Học Phân Tử – Viện Di Truyền Nông nghiệp – Từ Liêm Hà Nội và Trại Thực nghiệm của Viện Di truyền Nông nghiệp – Văn Giang – Hưng Yên

Thời gian nghiên cứu: 2004-2008

7. Bố cục của luận án

Nội dung chính của luận án được thể hiện trong 129 trang, gồm 4 trang mở đầu, 35 trang tổng quan, 11 trang vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu, 77 trang kết quả nghiên cứu và thảo luận, 2 trang kết luận và đề nghị, tài liệu tham khảo với 30 tài liệu tiếng Việt, 85 tài liệu tiếng Anh. Kết quả nghiên cứu có 19 bảng, 11 biểu đồ, 43 hình và các hình ảnh thí nghiệm. Phần phụ lục bao gồm các bảng, kết quả phân tích xử lý số liệu.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Trên cơ sở tổng hợp phân tích chúng tôi nhận thấy rằng:

Công tác tạo, chọn giống cây cà chua ở nước ta đã luôn được quan tâm chú trọng bởi ý nghĩa kinh tế của loại cây này. Các giống cà chua chủ yếu được chọn tạo theo phương pháp truyền thống là nhập nội và lai tạo.

Chuyển gen là một công cụ bổ sung cho chọn tạo giống truyền thống và có thể giúp cho việc mở rộng các nguồn gen có lợi sang các giống khác. Mặc dù có những thành công trong chuyển gen vào cà chua, có nhiều kết quả và nhiều nghiên

cứu rất phức tạp nhiều công đoạn nhưng hầu hết các quy trình từ nuôi cấy mô đến chuyển gen đều rất công kềnh, nặng nề và chưa đề cập đến các dạng hoang dại, đó là một nguồn gen vô cùng phong phú cho công tác chọn tạo giống cà chua.

Có rất nhiều các phương pháp chuyển gen khác nhau: chuyển gien trực tiếp và gián tiếp. Trong các phương pháp chuyển gen trên thì chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* là phương pháp tối ưu hơn cả và thường được sử dụng nhất là đối với cây hai lá mầm.

Để thực hiện thành công các nghiên cứu chuyển gen thì một trong những khâu quan trọng nhất là tái sinh cây trong *in vitro*, hệ số tái sinh càng cao thì hiệu quả chuyển gen càng lớn, đồng nghĩa với hệ số cây chuyển gen thu được càng cao.

Một số cây trồng và sản phẩm nông nghiệp biến đổi gen đã và đang được nhập vào nước ta qua con đường chính thức hoặc không chính thức. Đang tồn tại một thực trạng là việc xác định và đánh giá cây trồng biến đổi gen chỉ được thực hiện với những cây chuyển gen được tạo ra ở Việt Nam, do chính những cơ quan đã tạo ra chúng, còn nguồn cây trồng và sản phẩm biến đổi gen nhập nội thì vẫn đang ở ngoài vòng kiểm soát.

CHƯƠNG 2

VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các giống, dòng cà chua được sử dụng:

- Balan, Pháp lùn: Các giống được trồng trong sản xuất từ lâu.
- P375, H18: Nhập nội từ Đài loan
- Dòng cà chua dại *L.pennelli* (dòng này có chứa gen bất dục đực TBC) được cung cấp từ AVRDC (Đài loan), với mục đích nghiên cứu làm vật liệu tạo giống ưu thế lai .

Kiểm tra độ nhiễm bệnh virus của giống chúng tôi sử dụng hạt giống từ các nguồn khác nhau : Từ Viện Di truyền Nông nghiệp, trung tâm AVRDC và một số được lấy từ các trạm giống.

- Hai *Virus* được nghiên cứu trong thí nghiệm này là 2 loại virút lan truyền qua hạt.

+ *Virus* gây ra bệnh khảm trên cà chua (Tomato Mosaic Virus - ToMV). Được miêu tả bởi Broadbent, (1976).

+ *Virus* gây bệnh khảm thuốc lá (Tobacco Mosaic virus - TMV). Được miêu tả bởi Samuel. G., (1934). Cả hai đều thuộc nhóm *Tobamovirus*.

- Các loại kháng thể đặc hiệu (IgG) và các kháng thể có gắn enzyme của 2 virus ToMV và TMV được cung cấp từ Hãng Bio-RAD, Pháp.

Chủng vi khuẩn và Vector mang gen kháng nấm:

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 có chứa plasmid pCAMBIA 1300 GLU-AP (Osmotin), mang 2 gen kháng nấm: *Glucanase-Osmotin*, *Chitinase* và gen kháng *Hygomicine* (*hpt*). Gen *hpt* có promoter 35S, còn gen *Glucanase-Osmotin* có promoter A9, cả 2 promoter này đều hoạt động rất mạnh ở genome thực vật,

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, có chứa vector pBI121 mang gen kháng nấm: *Defensin* và gen kháng *Kanamycin* (*nptII*). Gen *nptII* có promoter *Nos*, còn gen *Defensin* có promoter *CaMV35S*, cả 2 promoter này đều hoạt động rất mạnh ở genome thực vật.

2.2. Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Xác định các môi trường nuôi cấy *in vitro* thu cây cà chua tái sinh phục vụ cho chuyển nạp gen

a. Ứng dụng kỹ thuật DAS-ELISA để kiểm tra tình hình nhiễm bệnh virus của hạt cà chua trước khi đưa vào nuôi cấy *In vitro*

b. Nội dung phục vụ cho những nghiên cứu tái sinh cây cà chua *in vitro*

1. Nghiên cứu công thức khử trùng mẫu
2. Nghiên cứu khả năng phát sinh mô sẹo (*callus*) của các cơ quan khác nhau
3. Nghiên cứu khả năng phát sinh chồi của các cơ quan khác nhau
4. Nghiên cứu khả năng nhân chồi của các cơ quan khác nhau
5. Tạo cây hoàn chỉnh.

Nội dung 2: Nghiên cứu chuyển gen *Glucanase-Osmotin* vào giống cà chua *Balan, H18* và dòng đại *L. pennelli*

1. Xây dựng quy trình chuyển gen *Glucanase-Osmotin* vào cây cà chua thông qua chủng vi khuẩn và Vector mang gen kháng nấm:

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 có chứa plasmid pCAMBIA 1300 GLU-AP (Osmotin), mang 2 gen kháng nấm: *Glucanase-Osmotin* và gen kháng *Hygomicine* (*hpt*). Gen *hpt* có promoter 35S, còn gen *Glucanase-Osmotin* có promoter A9, cả 2 promoter này đều hoạt động rất mạnh ở genome thực vật.

2. Đánh giá hiệu suất chuyển gen và kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen chuyển.
3. Thu được cây cà chua có gen Glucanase-Osmotin.

Nội dung 3 :Nghiên cứu chuyển gen Defencin kháng nấm vào cà chua H18 và *Licopersicon pennelli*

1. Nghiên cứu quá trình chuyển gen *Defensin* vào cây cà chua thông qua chủng vi khuẩn và Vector mang gen kháng nấm sau:

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, có chứa vector pBI121 mang gen kháng nấm: *Defensin* và gen kháng *Kanamycin* (*nptII*). Gen *nptII* có promoter *Nos*, còn gen *Defensin* có promoter *CaMV35S*, cả 2 promoter này đều hoạt động rất mạnh ở genome thực vật.

2. Đánh giá hiệu suất chuyển gen và kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen chuyển.
3. Thu được cây cà chua có gen *Defensin*

Nội dung 4: Nghiên cứu chuyển gen Chitinase vào cà chua giống P 375 Và Pháp lùn

1. Xây dựng quy trình chuyển gen *Chitinase* vào cây cà chua thông qua vi khuẩn và vector sau:

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 có chứa plasmid pCAMBIA 1300 CHI-GLU, mang gen kháng nấm: *Chitinase* và gen kháng *Hygomicine* (*hpt*). Gen *hpt* có promoter 35S, còn gen *Chitinase* có promoter A9, cả 2 promoter này đều hoạt động rất mạnh ở genome thực vật,

2. Đánh giá hiệu suất chuyển gen và kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen chuyển.
3. Thu được cây cà chua có gen *Chitinase*.

2.3. Các phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Clark và Adams 1977) là một kỹ thuật miễn dịch liên kết Enzyme dạng cặp chẵn đang được sử dụng rộng rãi nhất để phát hiện các tác nhân gây bệnh thực vật.

Phương pháp DAS-ELISA: gồm 5 bước thực hiện (phụ lục I).

2.3.1. Chuẩn bị mẫu cho phép thử ELISA

- Hạt thu thập từ các nguồn khác nhau. Mỗi nguồn thu thập được phân lô/giống (12 000 hạt/lô), mỗi mẫu lấy 4000 hạt và nghiền trong dung dịch đệm P.B.S.-T + P.V.P

- Kháng thể đặc hiệu và kháng thể có gắn *enzyme* được pha loãng trong dung dịch P.B.S.-T + 2% P.V.P. theo tỷ lệ cho sẵn của hãng.

- Chất hiện màu: hoà 1 viên /5 ml dung dịch đệm Substrat.

2.3.2. Phương pháp nuôi cấy mô

Dựa vào các tài liệu tham khảo của Murashige ADN Skoog (MS-1962) các tài liệu tham khảo của Peres L. và cs. 2002, Sung H. Park (2003), Moghaieb R. và cs. (2004) và N. Gorinnova và cs. (2005).

2.3.2.1. Khử trùng mẫu

- Hạt cà chua cho vào ống đong 30 ml cồn ethanol 70% để khử trùng bề mặt trong

1 phút. Sau đó hạt được xử lý với dung dịch *Hypoclorit calcium* 10% cho thêm 2 giọt Tween 20 với 3 thời gian khác nhau: 10, 15 và 20 phút, mẫu được rửa lại 4 lần với nước cất 2 lần trong vòng 30 phút rồi hạt được gieo lên môi trường gieo hạt pH 5,7, chúng được đặt trong điều kiện $t^0 = 25^{\circ}\text{C} \pm 2$, ánh sáng tự nhiên.

2.3.2.2. Nghiên cứu khả năng tạo mô sẹo (*callus*)

Mỗi thí nghiệm dùng 150 chồi (50 chồi x 3 lần nhắc lại). Sau khi hạt cà chua được gieo trong đĩa petri, chúng nảy mầm và khi cây được 10-12 ngày thì các lá mầm, lá thật và trụ lá mầm được cắt nhỏ và đưa vào nuôi cấy trong môi trường tạo mô sẹo. Các mẫu cấy được đặt trong điều kiện $t^0 = 25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, để từ 7-10 ngày trong tối, sau đó đưa ra ánh sáng tự nhiên. Kết quả được ghi lại sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3.2.3. Nghiên cứu khả năng tạo chồi, nhân chồi và tạo cây hoàn chỉnh

Các mẫu tạo *callus* được tách và cấy chuyển sang môi trường tạo chồi. sau 4-5 tuần các chồi được tách và chuyển sang môi trường nhân chồi, sau đó chúng được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh.

2.3.2.4. Phương pháp thống kê: Chúng tôi theo dõi hệ số nhân chồi trung bình/mẫu của các bộ phận trụ lá mầm, lá thật và lá mầm của 5 giống và độ lệch chuẩn của trung bình 3 lần nhắc lại cũng được tính toán theo chương trình IRRISTAT 4.0.

2.3.3. Phương pháp thí nghiệm chuyển gen Chuyển gen gián tiếp qua *Agrobacterium tumefaciens*. (dựa theo quy trình của Swapan K. Datta và cs. 1997, của Sung H. Park 2003 Pravda S. và cs. (2005) và N. Gorinova (2005).

Kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen chuyển

Sử dụng kỹ thuật PCR với các môi đặc trưng.

Các môi đặc trưng (chuyển gen <i>Glucanase</i>)	Các môi đặc trưng (chuyển gen <i>Defensin</i>)
HPT5 5'-CTGCCTGAAACCGAAGTGC-3'	NPT5':
HPT3 5'-CTTCTGCGGGCGATTTGTG- 3'	5'CCGCCGATGACGCGGGACAAGCC-3'

	NPT3': 5'- GGTCCGCCACACCCAGCCGGCCA-3'
GL.F: 5'-GGGGCTCAATCGATAGGTGGT-3' GL.R: 5'-GCCGACAGTGGTCCCAAAGAT-3'	Def.F: 5'-AGTCGAGTGAGATGAATAAA-3' Def.R: 5'-CTCTTTATTCATCTCACTCGACT-3';
AP.F: 5'- ATGGGCAACTTGAGATCTTCT-3' AP.R: 5'-GCCGACAGTGGTCCCAAAGAT-3'	Các môi đặc trưng (chuyển gen <i>Chitinase</i>)
	CHI.F: 5'-ATGGGGAAGAATAGGATGATG-3' CHI.R: 5'-GCCGACAGTGGTCCCAAAGAT-3'

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Một số kết quả nghiên cứu quy trình tái sinh cây cà chua phục vụ cho công tác chuyển gen

3.1.1 Ứng dụng kỹ thuật DAS-ELISA để kiểm tra tình hình nhiễm bệnh virus của cà chua trước khi đưa vào nuôi cấy *In vitro*

Mẫu hạt được thu thập từ các nguồn khác nhau: Sản xuất từ các trạm giống cung cấp cho người trồng rau ở Tây Tựu, chợ buổi, vì vậy chúng tôi đã kiểm tra tình trạng sức khỏe trước khi đưa vào nuôi cấy. Hạt được thu thập từ tập đoàn cà chua của Viện Di truyền Nông nghiệp mặc dù đã được kiểm soát trong các khâu sản xuất và thu hái, song vẫn qua kiểm tra ELISA. Kết quả cho thấy hạt cà chua ở thị trường tự do có mặt của virút *ToMV* và *TMV*, như vậy hai bệnh này có mặt trong quá trình sản xuất cà chua. Có thể việc loại bỏ các cây bị nhiễm bệnh hoặc các cây được nghi là nhiễm bệnh trong quá trình sản xuất còn chưa thật triệt để, nên trong quá trình thu hoạch quả để lấy hạt có thể có những sơ xuất nên thu cả những quả của cây đã bị bệnh. Còn hạt cà chua được thu từ tập đoàn cà chua của Viện Di truyền Nông nghiệp, và dòng cà chua đại *L.pennelli* được cung cấp từ AVRDC (Đài loan) đã được kiểm soát chặt chẽ trong quá trình sản xuất và thu hái, vì vậy không thấy có mặt của 2 bệnh virút này, vì vậy những rủi ro về việc thu quả có mang mầm bệnh đã được loại trừ. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy độ chính xác và độ nhạy của phép thử DAS-ELISA thật đáng tin cậy. Các mẫu sạch bệnh này đã được sử dụng để đưa vào các thí nghiệm biến nạp gen.

3.1.2. Một số kết quả Nghiên cứu quy trình tái sinh cây cà chua phục vụ cho công tác chuyển gen

Để thực hiện thành công các nghiên cứu chuyển gen thì một trong những khâu quan trọng nhất là tái sinh cây *in vitro*, hệ số tái sinh càng cao thì hiệu quả chuyển gen càng lớn, đồng nghĩa với hệ số cây chuyển gen thu được càng cao. Chúng tôi đã nghiên cứu 4 giống cà chua thương mại và loài cà chua dại *L.pennelli* (dòng mang gen bất dục đục TBC) cho các mục đích lai tạo sau này, nhằm tạo ra các dòng giống có khả năng tái sinh cao, bất dục đục tế bào chất (TBC) cần thiết cho công tác chọn, tạo giống cà chua lai. Những mẫu trụ lá mầm, lá thật và lá mầm đã được sử dụng trong thí nghiệm này.

3.1.2.1. Lựa chọn phương pháp khử trùng mẫu

Sau khi khử trùng hạt được chuyển vào môi trường gieo hạt, mỗi bình đặt 10-12 hạt. Sau đó các bình được để trong phòng nuôi cây, với ánh sáng tự nhiên. Sau khoảng 7 ngày hầu như các hạt đều nảy mầm. Sau 12 ngày kể từ ngày gieo hạt, quan sát cây mọc và phát triển trên môi trường. Tính tỷ lệ cây mọc và phát triển tốt trên môi trường và tính số cây nhiễm, cây đã chết hoặc không mọc. Những cây phát triển tốt là những cây có lá xanh, rễ phát triển tốt.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy: Đối với khử trùng bằng *Hypochlorit calcium* 10% + Tween 20 cho thấy có sự tỷ lệ thuận giữa việc gia tăng thời gian khử trùng với tỷ lệ mẫu sống. Với thời gian 10 phút, tỷ lệ mẫu sống chiếm 70,3%, với thời gian 15 phút tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất 90%. Tuy nhiên nếu tăng thời gian lên quá ngưỡng cho phép - 15 phút thì số lượng mẫu chết tăng lên cao (24%%) làm giảm tỷ lệ mẫu sống (73,3%). Vì vậy chúng tôi đã lựa chọn chế độ khử trùng hạt bằng với *Hypochlorit calcium* 10% + Tween 20 với thời gian 15 phút là phương pháp khử trùng tối ưu và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2.2. Đánh giá khả năng tạo mô sẹo (*callus*) của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của các chất điều hòa sinh trưởng

3.1.2.2.1. Đánh giá khả năng tạo *callus* của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Kinetin+IAA (NAA)

Sau khi hạt nảy mầm *in vitro* được 10-12 ngày, các lá mầm (Cotyledon) và trụ lá mầm (hypocotyl) được thu thập làm mẫu cấy, tất cả được cắt nhỏ với kích thước 0,1-0,3 cm trong điều kiện khử trùng rồi đưa vào nuôi cấy trong môi trường tạo mô sẹo (hình 2). Các mẫu cấy được đặt trong buồng tối từ 7 - 10 ngày, với nhiệt độ $t^0 = 25^0C \pm 2$, sau đó chúng được đưa ra ánh sáng tự nhiên. Sau 4 tuần các mô sẹo đã phát triển rất nhanh, các kết quả được ghi lại. Từ kết nghiên cứu cho thấy sau 4 tuần nuôi

cây trên môi trường MS với tổ hợp K+IAA (NAA), tất cả các giống (dòng) đều có khả năng tạo *callus*, tuy nhiên tỷ lệ tạo *callus* của các giống khác nhau là khác nhau và các bộ phận khác nhau trên cây cà chua cũng cho các kết quả khác nhau. Dòng cà chua đại *L. Pennelli* và giống cà chua thương mại P375 cho tỷ lệ tạo *callus* cao nhất, còn giống Pháp lùn cho tỷ lệ thấp nhất. Tuy nhiên chúng có chung một quy luật:

Có 2 loại mô sẹo được tái sinh: (1) Ở công thức K1 và K2 mô sẹo có màu vàng trắng xanh, có cấu trúc dạng khối cầu nhỏ, tương đối chắc (compact) và khô, có khả năng tái sinh cây sau nhiều lần cấy chuyển. (2) khi nồng độ Kinetin tăng cao làm xuất hiện nhiều chồi màu trắng ngả nâu cấu trúc xốp, mềm và tạo ra nhiều cụm chồi bất thường khó có khả năng sinh phôi làm giảm tỷ lệ chồi hữu hiệu, đó là các *callus* có chất lượng không tốt [hình 4 (2-3)].

Nhìn chung, tỷ lệ tạo *callus* trung bình ở cả 5 giống với những tổ hợp khác nhau của Kinetin và IAA (NAA) không cao lắm, chỉ đạt 68,7%; 60,3% và 77,3% tương ứng với mẫu là trụ lá mầm, lá thật và lá mầm.

3.1.2.2.2. Đánh giá khả năng tạo *callus* của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Zeatin+IAA (NAA)

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy sự tạo thành *callus* ở tổ hợp với Zeatin cũng có cùng một quy luật như với tổ hợp Kinetin, nghĩa là các giống khác nhau cho các tỷ lệ tạo *callus* khác nhau, Dòng *L. pennelli* cho tỷ lệ tạo *callus* cao nhất tương ứng 78,2%; 65,9% và 88,0%. Đặc biệt ở tổ hợp này ngoài cấu trúc có khả năng sinh phôi như đã miêu tả ở trên, có nhiều mẫu phản ứng phát sinh rễ trực tiếp. Cũng ở tổ hợp này, quan sát thấy có hiện tượng phản ứng tái sinh cây trực tiếp từ mép lá.

Nhìn tổng quát: tỷ lệ tạo *callus* trung bình ở cả 5 giống với những tổ hợp khác nhau của Zeatin và IAA (NAA) thấp hơn so với tổ hợp với Kinetin chỉ đạt 66,2%; 55,4% và 76,4% tương ứng với mẫu là trụ lá mầm, lá thật và lá mầm.

3.1.2.2.3. Đánh giá khả năng tạo *callus* của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của BA (benzyladenin) + IAA (NAA)

Ở tổ hợp này chúng tôi sử dụng nồng độ của BA từ 0,5 -2,0 mg/l.

Đây là tổ hợp cho tỷ lệ tạo *callus* cao nhất và *callus* có chất lượng tốt nhất, khả năng tái sinh cao nhất trong 3 tổ hợp. Khi nồng độ BA tăng lên đến ngưỡng 1 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l NAA, tất cả các giống đều cho tỷ lệ tạo *callus* cao nhất Trung bình đạt 77,8%; 68,0% và 87,9 (bảng 5) ở môi trường nuôi cấy MS (1962) + 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + 3% sucrose +7 mg/l agar. Đây là môi trường được sử dụng cho các

nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2.3. Đánh giá khả năng tạo chồi của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của các chất điều hoà sinh trưởng

Trong nuôi cấy mô giai đoạn tái sinh chồi việc kết hợp giữa tỷ lệ Cytokinin/Auxin được sử dụng rộng rãi và trong nhiều trường hợp nó tỏ ra không thể thay thế trong nuôi cấy *in vitro* về tác dụng kích thích tạo chồi mạnh cũng như nhân nhanh chồi.

3.1.2.3.1. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Kinetin+IAA (NAA)

Nhìn tổng quát cho thấy tỷ lệ tạo chồi ở các môi trường có các tổ hợp khác nhau của Kinetin với IAA và NAA thấp, cụ thể tỷ lệ tạo chồi trên các môi trường với các tổ hợp của **Kinetin trung bình chỉ đạt 37,2%** (lá mầm); **19,3%** (trụ lá mầm) và **13,6%** (lá thật). Kết quả tốt nhất khi nuôi cấy mô sẹo trên môi trường **K3: MS (1962) + 2mg/l Kinetin + 0,1mg/l IAA**. Ở công thức với Kinetin mầm chồi mịn, chắc.

3.1.2.3.2. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của BA +IAA (NAA)

Biết rằng khi sử dụng BA ở nồng độ cao mẫu bị thủy tinh hóa nhiều, giảm tỷ lệ chồi hữu hiệu vì vậy chúng tôi đã sử dụng ngưỡng nồng độ BA trong khoảng 1-2 mg/l.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tạo chồi cao nhất là các mô sẹo từ lá mầm với trung bình tổng là 44,9%, trụ lá mầm là 22,3%, và thấp nhất là mẫu lá thật với trung bình tổng là 16,9%. Kết quả tốt nhất đạt được khi nuôi cấy mô sẹo trên môi trường B4: [MS(1962)+ 2mg/l BA+0,1mg/l IAA]. Dòng đại *L.pennelli* cho tỷ lệ tạo chồi cao nhất, còn giống H18 cho tỷ lệ tạo chồi thấp nhất. Mầm chồi khoẻ, to hơi xốp. Quan sát thấy có hiện tượng phát triển cây trực tiếp trên môi trường BA, các chồi nhỏ và yếu hơn so với các cây con trên môi trường với Zeatin.

3.1.2.3.3. Đánh giá khả năng tái sinh chồi của các giống với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Zeatin +IAA (NAA)

Trong công thức này chúng tôi sử dụng Zeatin với nồng độ từ 1-2 mg/l.

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy: Tỷ lệ tạo chồi từ mô sẹo (lá mầm, trụ lá mầm và lá thật) của 5 giống cho kết quả cao nhất đạt được khi nuôi cấy mô sẹo trên môi trường Z3: (MS (1962) + 2mg/l zeatin + 0,1mg/l IAA). Dòng đại *L.pennelli* cho tỷ lệ tạo chồi cao nhất: 81,6% (lá mầm); 40,8% (trụ lá mầm), và 30,9% (đối với lá thật).

Giống số 2 cho tỷ lệ tạo chồi thấp nhất: 58,9% (lá mầm); 27,8% (trụ lá mầm), và 17,7% (lá thật).

Ngoài khả năng cho tỷ lệ tạo chồi cao, còn cho thấy mầm chồi có tiềm năng nhân chồi lớn, các mầm chồi phát triển khỏe và đôi khi phát triển trực tiếp thành cây con rất khỏe mạnh

3.1.2.3.4. Đánh giá khả năng nhân chồi của 5 giống khác nhau với các nồng độ và tổ hợp khác nhau của các chất điều hòa sinh trưởng

Sau khi tái sinh chồi, việc nhân nhanh chồi vô cùng quan trọng, vì tốc độ nhân giống phụ thuộc vào hệ số nhân chồi. Chính vì vậy tìm ra môi trường tối ưu cho khâu nhân nhanh chồi là hết sức cần thiết. Chồi của 5 giống cà chua có kích thước 3-5 mm được tách ra và đưa vào các môi trường nhân chồi. Các kết quả được trình bày ở các bảng 3.

a. Ảnh hưởng của các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Kinetin với IAA, NAA lên quá trình nhân chồi của các giống

Biết rằng khi tăng nồng độ Kinetin sẽ thu được hệ số nhân chồi cao hơn, vì vậy trong thí nghiệm này chúng tôi đã sử dụng Kinetin với nồng độ từ 0,5-5,0 mg/l.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy ngưỡng tối ưu cho tỷ lệ tái sinh chồi của 5 giống tham gia thí nghiệm đạt đến khi nồng độ Kinetin ở 2 mg/l. ở ngưỡng tối ưu này 2K kết hợp với 0,1 mg/l IAA cho hệ số nhân cao nhất với tất cả 5 giống ở cả 3 loại mẫu cấy. Trung bình tổng của cả 5 giống khi nuôi cấy ở môi trường này đạt: hệ số 3,5 (lá mầm); 3,6 (trụ lá mầm); 3,0 (lá thật). Dòng đại *L.pennelli* cho tỷ lệ nhân chồi cao nhất trung bình đạt 3,9 (trụ lá mầm); 3,6 (lá mầm) và 3,2 (lá thật). ở tổ hợp với Kinetin chồi xanh, dài.

b. Ảnh hưởng của các nồng độ và tổ hợp khác nhau của BA với (IAA, NAA) lên quá trình nhân chồi của các giống

Biết rằng khi sử dụng BA ở nồng độ cao giảm tỷ lệ chồi hữu hiệu vì vậy chúng tôi đã sử dụng ngưỡng nồng độ BA trong khoảng 0,3 -2,5 mg/l. Đồng thời kết hợp một lượng nhỏ IAA và NAA. Nồng độ tăng lên đến 0,5 B +0,5 IAA, cho thấy hệ số nhân chồi tăng lên rõ rệt tương ứng ở ba loại mẫu cấy là 4,1; 3,6 và 3,8. tiếp tục tăng BA lên 1,0 mg/l cho tỷ lệ hình thành chồi cao hơn. Tuy nhiên ở nồng độ này cùng với độ ẩm trong phòng nuôi cây đã xuất hiện hiện tượng thủy tinh hóa. Dòng cà chua đại *L.pennelli* vẫn cho khả năng nhân chồi cao nhất tương ứng ở cả ba bộ phận mẫu cấy: 4,6; 4,1 và 4,2. (bảng 10 và hình 13). Với công thức B4: 0,5 BA +

0,5 IAA hệ số nhân chồi đạt 4,1; 3,6 và 3,8 cao hơn so với tổ hợp với Kinetin (3,6; 3,0 và 3,5).

c. Ảnh hưởng của các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Zeatin với IAA, NAA lên quá trình nhân chồi của các giống

Ở công thức tổ hợp với Zeatin, chúng tôi sử dụng nồng độ từ 0,5-4 mg/l.

Bảng 3.1: Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của các nồng độ và tổ hợp khác nhau của Zeatin với IAA và NAA lên quá trình nhân chồi

Dòng/ Giống	Công thức (mg/l) MS (1962) + Tổ hợp Z+IAA (NAA)	Hệ số nhân (số chồi trung bình X)		
		Trụ lá mầm (X)	Lá thật (X)	Lá mầm (X)
P 375	Z1: 0,5 Z + 0,5 IAA	2,4	2,1	3,7
	Z2: 1,0 Z + 0,5 NAA	2,0	1,8	2,6
	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	4,5	3,6	4,2
	Z4: 2,0 Z + 1,0 2,4-D	1,9	1,5	1,8
	Z5: 2,5 Z + 0,5 NAA	1,7	1,9	2,3
	Z6: 4,0 Z + 0,5 IAA	2,1	2,3	2,1
	<i>Trung bình (X)</i>	2,3	2,1	2,2
H18	Z1: 0,5 Z + 0,5 IAA	2,3	1,9	2,1
	Z2: 1,0 Z + 0,5 NAA	2,0	1,9	2,3
	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	4,2	3,5	4,1
	Z4: 2,0 Z + 1,0 2,4-D	2,0	1,8	1,9
	Z5: 2,5 Z + 0,5 NAA	2,1	1,7	2,0
	Z6: 4,0 Z + 0,5 IAA	1,8	1,5	1,9
	<i>Trung bình (X)</i>	2,2	1,8	2,0
Balan	Z1: 0,5 Z + 0,5 IAA	2,2	2,1	3,7
	Z2: 1,0 Z + 0,5 NAA	2,5	1,8	2,6
	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	4,6	3,7	4,3
	Z4: 2,0 Z + 1,0 2,4-D	1,9	1,5	1,8
	Z5: 2,5 Z + 0,5 NAA	2,1	1,9	2,3
	Z6: 4,0 Z + 0,5 IAA	2,2	2,0	2,1
	<i>Trung bình (X)</i>	2,3	2,0	2,1
Pháp lùn	Z1: 0,5 Z + 0,5 IAA	2,5	2,1	3,6
	Z2: 1,0 Z + 0,5 NAA	2,2	1,8	2,69
	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	4,4	3,5	4,2
	Z4: 2,0 Z + 1,0 2,4-D	2,0	1,6	1,9
	Z5: 2,5 Z + 0,5 NAA	2,3	2,2	2,2
	Z6: 4,0 Z + 0,5 IAA	2,1	2,0	2,2
	<i>Trung bình (X)</i>	2,3	1,9	2,1
L. pennelli	Z1: 0,5 Z + 0,5 IAA	3,6	2,7	3,6
	Z2: 1,0 Z + 0,5 NAA	3,8	2,8	3,5
	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	5,6	4,1	4,9
	Z4: 2,0 Z + 1,0 2,4-D	2,7	2,5	2,8

	Z5: 2,5 Z + 0,5 NAA	3,0	2,8	3,1
	Z6: 4,0 Z + 0,5 IAA	2,6	2,4	2,5
	Trung bình (X)	2,7	2,2	2,5
	Trung bình tổng E X	2,4	2,0	2,2
TB (X)	Z3: 2,0 Z + 0,1IAA	4,7	3,7	4,3

Qua kết quả bảng 3.1 cho thấy: Khả năng nhân chồi tăng lên cùng với việc tăng nồng độ Zeatin đến ngưỡng 2,0 mg/l + 0,1 IAA, ở ngưỡng này hệ số nhân của mẫu là trụ lá mầm tăng hơn hai lần đạt (4,5) còn với mẫu là lá thật hệ số nhân tăng lên 1,5 lần tương ứng (3,6) còn mẫu là lá mầm hệ số nhân tăng lên xấp xỉ 1,2 lần (4,2) và ở ngưỡng nồng độ này (2 Z + 0,1 IAA) hệ số nhân của tất cả các giống với giá trị trung bình trong cả 5 giống đạt 4,7 (trụ lá mầm); 3,7 (lá thật) và 4,3 (lá mầm) cao nhất so với tổ hợp Kinetin và BA, cũng ở công thức này các chồi rất khoẻ, mập và tỏ ra có sức sống cao.

3.1.2.5. Tạo cây hoàn chỉnh

Chúng tôi sử dụng 2 tổ hợp chất kích thích sinh trưởng là NAA và IAA kết hợp với một số Cytokinin (Kinetin, Zeatin và BA)

3.1.2.5.1. Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các tổ hợp khác nhau của chất kích thích sinh trưởng NAA lên quá trình tạo rễ và cây hoàn chỉnh *in vitro*

Chúng tôi đã sử dụng nồng độ NAA từ 0,1- 1,0 mg/l.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy: Khả năng tạo cây hoàn chỉnh cao nhất khi nồng độ NAA đạt 0,5 mg/l có kết hợp với 0,02 Z. Trung bình của 5 giống đạt 92,4 (trụ lá mầm); 85,4 (lá thật) và 88,3 (lá mầm). Tỷ lệ cao nhất vẫn là dòng đại L. Pennelli tương ứng 97,6; 88,1 và 94,7. Trong nhóm cà chua thương mại có giống số Balan cho tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh cao nhất tương ứng 97,6; 88,1 và 94,7. Nhìn chung các cây hoàn chỉnh có bộ rễ thu được dài song không to khoẻ, quan sát thấy bị đen ở gốc.

3.1.2.5.2. Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của các tổ hợp khác nhau của chất kích thích sinh trưởng IAA với lên quá trình tạo rễ và cây hoàn chỉnh

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng IAA nồng độ từ 0,2-1,5 mg/l.

Bảng 3.2: Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của các nồng độ và tổ hợp khác nhau của chất kích thích sinh trưởng IAA kết hợp với một số Cytokinin (Kinetin, Zeatin và BA) lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Dòng/ Giống	Công thức (mg/l) MS(1962)+ Tổ hợp IAA	Tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh (%)		
		Trụ lá mầm (X)	Lá thật (X)	Lá mầm (X)
P 375	0,2 IAA + 2,5 K	83,7	55,0	71,6
	0,5 IAA + 0,1BA	86,8	65,0	78,3
	0,5 IAA + 0,05 K	84,8	71,6	83,3

	1 IAA + 2,0 K	93,3	80,0	86,6
	1,5 IAA + 0,02 Z	83,3	76,6	85
	<i>Trung bình (X)</i>	<i>84,6</i>	<i>69,6</i>	<i>81,0</i>
H18	0,2 IAA + 2,5 K	82,1	54,6	72,9
	0,5 IAA + 0,1BA	85,7	76,1	83,1
	0,5 IAA + 0,05 K	85,6	73,6	82,9
	1 IAA + 2,0 K	90,4	80,0	89,6
	1,5 IAA + 0,02 Z	84,3	76,6	82,4
	<i>Trung bình (X)</i>	<i>85,6</i>	<i>72,2</i>	<i>82,2</i>
Ba lan	0,2 IAA + 2,5 K	85,4	78,0	76,7
	0,5 IAA + 0,1BA	88,9	85,0	87,3
	0,5 IAA + 0,05 K	87,8	83,5	86,3
	1 IAA + 2,0 K	95,3	88,4	94,4
	1,5 IAA + 0,02 Z	85,3	79,3	85,2
	<i>Trung bình (X)</i>	<i>88,5</i>	<i>82,8</i>	<i>86,0</i>
Pháp lùn	0,2 IAA + 2,5 K	84,5	58,1	77,8
	0,5 IAA + 0,1BA	89,6	83,4	86,6
	0,5 IAA + 0,05 K	88,9	83,8	87,2
	1 IAA + 2,0 K	94,7	86,6	93,6
	1,5 IAA + 0,02 Z	87,9	82,5	85,3
	<i>Trung bình (X)</i>	<i>89,1</i>	<i>78,9</i>	<i>86,1</i>
<i>L. pennell</i>	0,2 IAA + 2,5 K	86,7	77,2	84,2
	0,5 IAA + 0,1BA	94,9	88,9	89,9
	0,5 IAA + 0,05 K	93,6	89,7	91,6
	1 IAA + 2,0 K	98,3	90,5	97,8
	1,5 IAA + 0,02 Z	84,4	84,6	86,1
	<i>Trung bình (X)</i>	<i>91,6</i>	<i>86,2</i>	<i>89,9</i>
	<i>Trung bình tổng E X</i>	<i>88,2</i>	<i>77,9</i>	<i>85,0</i>
TB (X)	IAA + 2,0 K	94,4	85,1	92,4

Nhận xét: Qua các kết quả thu được ở bảng 3.2 chúng tôi nhận thấy rằng ảnh hưởng của nồng độ IAA trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* ở cà chua cao hơn so với khi sử dụng NAA. Với công thức có nồng độ 1mg/l IAA + 2mg/l Kinetin cho rễ khoẻ, dài và trắng, biểu hiện rễ có chất lượng nhất và cây khoẻ. Thời gian tạo rễ cũng sớm hơn so với các công thức với tổ hợp của NAA (2,5 tuần so với 3 tuần).

3.2. Những kết quả ban đầu về chuyển gen kháng nấm *Glucanase* vào 3 giống (dòng) cà chua

Mục đích nghiên cứu là thu được các dòng cà chua mang gen kháng nấm *Glucanase-Osmotin* cần thiết cho công tác chọn tạo giống cà chua kháng bệnh nấm. (có thể thu được dòng bất dục đực TBC). Chúng tôi quan tâm nhiều đến sự phản ứng của các kiểu gen của các giống (dòng) với thời gian đồng nuôi cấy và các nồng độ vi

khuẩn trong quá trình biến nạp. Cũng như quan sát ảnh hưởng của các loại kháng sinh sử dụng lên hiệu quả biến nạp. Các mẫu được dùng trong chuyển gen là lá mầm (LM) và trụ lá mầm (TLM).

3.2.1. Quá trình biến nạp gen kháng nấm *Glucanase* (Dựa theo quy trình của Swapan K. Datta và cs. 1997, của Sung Park và cs, 2003 và N. Gorinova (2005).

Các mẫu trụ lá mầm và lá mầm sau khi kết thúc tiền nuôi cấy, chúng được gây những vết thương mới tạo điều kiện cho sự tiếp xúc của vi khuẩn. Đặt các mẫu cấy vào dung dịch vi khuẩn và môi trường MS1 lỏng trong đĩa petri với 3 nồng độ khác nhau (1:10; 1:15 và 1:20), lắc nhẹ khoảng 5-7 phút để làm tăng khả năng tiếp xúc của tế bào chủ và vi khuẩn. Sau khi các mẫu lá được làm khô bằng giấy thấm whatman (quá trình này nhằm loại bỏ bớt vi khuẩn bám quá nhiều trên bề mặt của mẫu, ức chế sự tái sinh của mẫu) rồi chuyển chúng sang môi trường có chứa 250 mg/l *Acetosiringone* để đồng nuôi cấy. Quá trình đồng nuôi cấy duy trì ở nhiệt độ 25°C +1, trong tối với 3 thời gian khác nhau: 36 tiếng 48 tiếng và 60 tiếng.

Các mẫu đối chứng cũng được tiến hành đồng thời các bước loại trừ công đoạn lây nhiễm và nuôi chung với vi khuẩn.

Bên cạnh các mẫu biến nạp chúng tôi cũng tiến hành thí nghiệm đối chứng với các mẫu lá không biến nạp trên môi trường tạo *callus* và tạo chồi.

3.2.2. Nghiên cứu khả năng tái sinh của các mẫu cấy trên môi trường có chứa kháng sinh

a. Tạo mô sẹo và tái sinh chồi

Sau khi nuôi chung, mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường chọn lọc MS1 có bổ sung đồng thời 2 loại kháng sinh: *Cefotaxime* (250 mg/l) và *Hygromycin* (50 mg/l). Sau ba tuần được nuôi cấy trong tối, những *callus* có khả năng sống sót trên môi trường chọn lọc được tiếp tục chọn lọc ít nhất 3 vòng trên môi trường chọn lọc MS1 với các kháng sinh tương ứng, với thời gian chiếu sáng 15/24 giờ nhiệt độ nuôi là 25°C ± 2°C.

b. Ảnh hưởng của kháng sinh lên khả năng tái sinh

Các thí nghiệm biến nạp với gen *Glucanase-Osmotin* sử dụng chủng vi khuẩn EHA105 có chứa plasmid pCAMBIA 1300 GLU-AP, mang 2 gen kháng nấm *Glucanase-Osmotin* và gen đánh dấu chọn lọc kháng *Hygromycine* (*hpt*). Gen *hpt* có promoter 35S, còn gen *Glucanase-Osmotin* có promoter A9, sau 3-4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi tính kháng với kháng sinh *Hygromycin* được bắt đầu biểu hiện. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra và đánh giá các mẫu biến nạp và quan sát thấy:

Trụ lá mầm	1: 10	228	1	1	-	2	0,88	1	0,44
	1: 15	264	2	7	1	10	3,79	6	2,27
	1: 20	288	1	2	2	6	2,08	1	0,34
Lá mầm	1: 10	282	1	3	1	5	1,77	3	1,04
	1: 15	291	3	11	2	16	5,50	12	4,12
	1: 20	276	1	3	2	6	2,17	3	1,09
Tổng		1638	8	27	8	44		26	
Giống H18									
Trụ lá mầm	1: 10	267	1	1	-	2	0,75	0	0,0
	1: 15	291	1	6	2	9	3,09	5	1,72
	1: 20	279	2	3	0	5	1,79	3	1,08
Lá mầm	1: 10	282	2	2	1	5	1,77	4	1,42
	1: 15	276	2	9	1	12	4,35	11	3,98
	1: 20	285	2	3	1	6	2,10	6	2,10
Tổng		1635	10	24	5	41		25	
Dòng <i>L. pennelli</i>									
Trụ lá mầm	1: 10	279	0	1	0	1	0,36	Các <i>callus</i> sau khi cấy chuyển nhiều lần bị nhạt dần và các chồi không có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh.	
	1: 15	291	2	4	0	6	2,06		
	1: 20	285	0	2	1	3	1,05		
Lá mầm	1: 10	294	1	1	0	2	0,68		
	1: 15	282	2	5	1	8	2,84		
	1: 20	285	2	3	0	5			
Tổng		1522	8	17	3	28			

Qua số liệu bảng 3.3 cho thấy kết quả chuyển gen vào 2 giống cà chua Balan, H18 và dòng đại *L. Pennelli* hiệu suất chuyển phụ thuộc vào sự phản ứng của từng giống đối với nồng độ và chủng vi khuẩn cũng như các loại kháng sinh sử dụng. Tuy nhiên chúng có chung một quy luật là hiệu quả biến nạp đạt cao nhất: (1) Ở mẫu là lá mầm sau đó đến mẫu là trụ lá mầm, (2) Với nồng độ vi khuẩn 1:15 (tương đương $OD_{600nm} = 0,3$), (3) Với thời gian đồng nuôi cấy trong 48 tiếng. Giống Balan cho hiệu quả biến nạp cao nhất tương ứng: lá mầm đạt **4,12%** và trụ lá mầm đạt **2,27%**. Các chồi phát triển khoẻ trên môi trường chọn lọc. Đặc biệt các mẫu *callus* của dòng *L. Pennelli* cho thấy phản ứng của kiểu gen dòng *L. Pennelli* rất mạnh với các kháng sinh sử dụng (*Cefotaxime* và *Hygromycin*) cũng như chủng vi khuẩn EHA 105 chứa plasmid pCAMBIA 1300 và hiệu quả biến nạp của *L. Pennelli* được coi bằng không.

11 cây cà chua chuyển gen được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc và phân

lập sau khi chuyển ra môi trường tạo cây hoàn chỉnh (MS 91962) + 2 mg/l K + 1mg/l IAA) chứa 50 mg/l *Hygromycin* và 250 mg/l *Cefotaxime* và được đánh số thứ tự từ (CGH181- CGH184) và (CGBL5- CGBL11).

3.2.4. Kiểm tra sự có mặt tạm thời của các gen chuyển

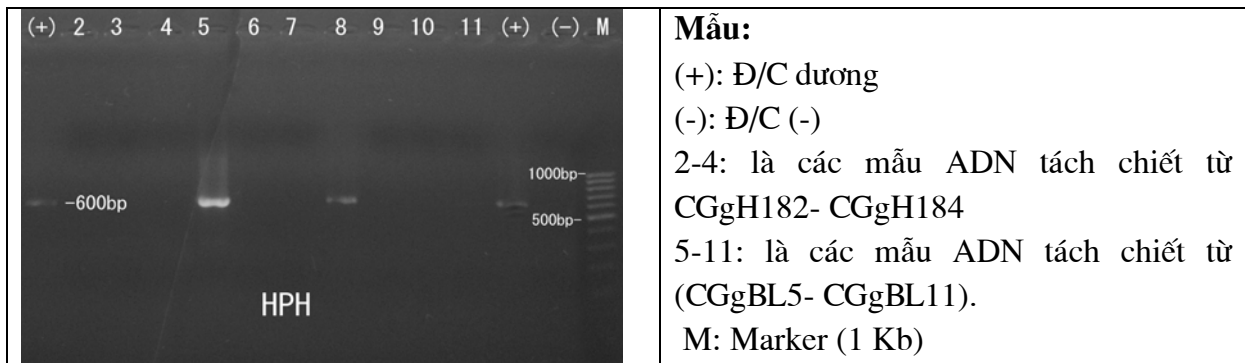
11 cây cà chua chuyển gen được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc và sau đó 1 cây bị nhiễm và chỉ còn lại 10 cây đó là (CGgH182- CGgH184) và (CGgBL5- CGgBL11). Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR (*Polymerase Chain Reaction*) với các cặp mồi đặc hiệu. Kỹ thuật PCR là một kỹ thuật phân tích di truyền hiện đại được sử dụng rộng rãi trong di truyền phân tử và mang lại hiệu quả cao.

Kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen *hpt*

Trước khi kiểm tra gen kháng nấm, chúng tôi thực hiện kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen *hpt*, chúng tôi đã sử dụng phương pháp PCR để kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen kháng kháng sinh *hpt*, sử dụng Marker chuẩn 1 kb. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại đoạn gen *hpt* được sử dụng là:

HPT5: 5'-CTGCCTGAAACCGAACTGC-3'

HPT3: 5'-CTTCTGCGGGCGATTTGTG- 3'



Hình 3.1: Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *hpt* trong các cây cà chua bằng kỹ thuật PCR

3.3. Kết quả chuyển gen *defensin* vào cà chua

Mục đích của thí nghiệm tạo ra cây cà chua mang gen *Defensin* nhằm kháng được một số bệnh nấm hại trên cây cà chua.

Chúng tôi đã nghiên cứu chuyển gen vào giống cà chua H18 và dòng hoang dại *L.pennelli* vì dòng này không có khả năng tạo chồi hoàn chỉnh khi được chuyển gen *Glucanase*. Những mẫu đã được sử dụng trong thí nghiệm này là lá mầm và trụ lá mầm.

3.3.1. Quá trình biến nạp gen *Defensin* (Dựa theo quy trình của của Sung Park và cs, 2003 và N. Gorinova (2005).

Quá trình chuyển nạp gen *Defensin* vào tế bào cà chua được thực hiện trên cơ sở vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được nhiễm vào các tế bào bị thương đang phân chia mạnh, vì vậy cần thiết phải qua giai đoạn tiên nuôi cấy, sau tiên nuôi cấy các mẫu lá mầm và trụ lá mầm lại được tạo thêm vết thương mới làm tăng khả năng tiếp xúc của vi khuẩn.

3.3.2. Các kết quả nghiên cứu khả năng tái sinh của các mẫu cấy trên môi trường có chứa kháng sinh.

a. Tạo mô sẹo và tái sinh chồi.

Được thực hiện như chuyển gen với *Glucanase* chỉ khác 1 điều khi chuyển gen *Defensin*, kháng sinh chọn lọc được sử dụng là *Kanamycin*.

b. Ảnh hưởng của kháng sinh lên khả năng tái sinh

Các thí nghiệm biến nạp với gen *Defensin* sử dụng chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, có chứa vector pBI121 mang gen kháng nấm: *Defensin* và gen kháng *Kanamycin* (*nptII*). Gen *nptII* có promoter *Nos*, còn gen *Defensin* có promoter 35S. Trong thí nghiệm này, sau 3-4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi tính kháng với kháng sinh *Kanamycin* được bắt đầu biểu hiện. Giống như các trường hợp chuyển *Glucanase–Osmotin*, các mô phát triển không đồng đều tùy thuộc vào giống cà chua và mẫu cấy:

- Đối với dòng *L. pennelli*, phần lớn các mô bị bạch tạng có khả năng phát triển nhưng trông chúng như bị tro hoá. Một phần nhỏ có khả năng tái sinh chồi không hoàn chỉnh.

- Đối với giống H18, quan sát thấy 2 loại mô: một loại có số lượng ít hơn, có cấu trúc sinh phôi hoặc đa chồi, trong số chúng xuất hiện chồi xanh phát triển bình thường, còn 1 loại thì bị hoá nâu không phát triển và chết

Ngoài ảnh hưởng của các kháng sinh chọn lọc và kháng sinh diệt vi khuẩn *Agrobacterium* dư thừa tồn đọng trong môi trường nuôi cấy có chứa các gen gây độc *vir*. cũng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào, thậm chí làm chết tế bào.

c. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy lên khả năng tái sinh chồi.

Quan sát các thí nghiệm ở nồng độ vi khuẩn 1:15 cho thấy đây là nồng độ vi khuẩn thích hợp tương đương nồng độ vi khuẩn đo ở bước sóng 600 nm với OD = 0,3

đã cho tỷ lệ tái sinh cao nhất. Quan sát các chồi tái sinh trên môi trường có chứa kháng sinh *Kanamycin* thu được sau khi đã chuyển gen, cho thấy: đồng nuôi cấy trong 48 tiếng cho tỷ lệ tái sinh cao nhất. Dòng *L. pennelli*. đạt một tỷ lệ tái sinh thấp (bảng 3.4).

- *Giống H18*. Giống này cho tỷ lệ tái sinh sau chuyển gen là tương đối cao.

3.3.3 Đánh giá hiệu quả biến nạp

Bảng 3.4. Hiệu quả biến nạp gen với các nồng độ vi khuẩn và thời gian xử lý khác nhau ở cà chua H18 và dòng *L. pennelli*.

Dòng/ Giống (Mẫu chuyển)	CT (Nồng độ VK)	Số mẫu thí nghiệm	Số mẫu tái sinh sau đồng nuôi cấy			Tổng (chồi) tái sinh	Tỷ lệ tái sinh	Tổng chồi tái sinh sống sót	Hiệu suất chuyển (%)
			36 tiếng	48 tiếng	60 tiếng				
Giống H18									
Trụ lá mâm	1: 10	269	0	1	-	2	0,74	1	0,37
	1: 15	271	1	5	2	8	2,95	6	2.21
	1: 20	277	2	3	0	5	18,0	4	1,44
Lá mâm	1: 10	280	2	3	1	6	2,14	4	1,43
	1: 15	272	2	9	2	13	4,78	12	4,41
	1: 20	275	2	3	2	7	2,54	5	1,82
Tổng			9	24	7				
Dòng <i>L. pennelli</i>									
Trụ lá mâm	1: 10	275	0	2	0	2	0,73	Các <i>callus</i> sau khi cấy chuyển nhiều lần bị nhạt dần và các chồi không có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh.	
	1: 15	281	2	4	1	7	2,49		
	1: 20	280	0	1	1	2	0,71		
Lá mâm	1: 10	279	1	1	1	3	1,07		
	1: 15	280	2	5	2	9	3,21		
	1: 20	283	2	2	0	4	1,41		
Tổng			7	15	5	28			

Qua số liệu cho thấy kết quả chuyển gen vào 2 giống cà chua H18 và dòng đại *L. pennelli* có sự khác nhau rõ rệt. Hiệu suất chuyển của giống H18 đạt rất cao. Còn dòng *L.pennelli* hiệu quả biến nạp bằng không. 10 cây cà chua chuyển gen được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc và phân lập sau khi chuyển ra môi trường tạo cây hoàn chỉnh được đánh số thứ tự từ (CGdH181- CđH1810), sau đó 3 cây CGdH181- CGdH183 bị nhiễm còn lại 7 cây là CGdH184- CđH1810.

3.3.4. Kiểm tra sự có mặt tạm thời của các gen chuyển

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR (*Polymerase Chain*

Reaction) với các cặp mồi đặc hiệu.

Kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen *nptII*

Sử dụng thanh chuẩn 1 Kb để so sánh. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại đoạn gen *nptII* được sử dụng là: NPT5' –CCGCCGATGACGCGGGACAAGCC và NPT3' –GGTCCGCCACACCCAGCCGGCCA



Hình 3.2. Các kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *nptII* trong các cây cà chua (H18) đã được chuyển gen

Kết quả điện di (hình III.4) cho thấy trong các cây cà chua đã được chuyển gen, có 7 cây biểu hiện sự có mặt gen mong đợi *nptII* được khuếch đại tương ứng 0,9 kb. Không có băng này ở trường hợp mẫu đối chứng (-).

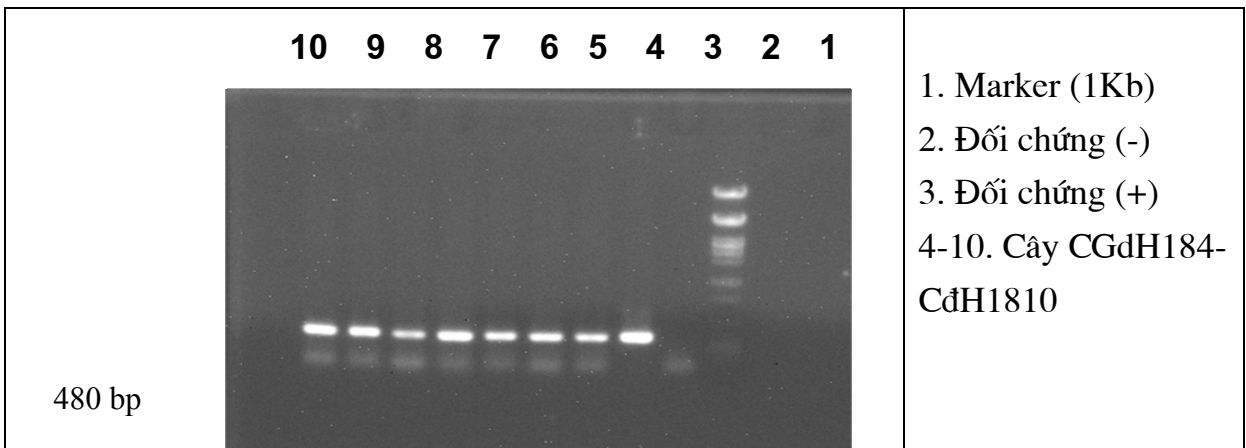
Kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen *Defensin*

Sử dụng thanh chuẩn 1 Kb để so sánh, với cặp mồi đặc trưng của gen *Defensin* là:

Def F: 5' -AGTCGAGTGAGATGAATAAA-3'

Def R1: 5' -CTCTTTATTCATCTCACTCGACT-3';

Kết quả điện di cho thấy trong 7 cây cà chua thu được trên môi trường tạo cây hoàn chỉnh có chứa kháng sinh *Kanamycin* có cả 7 cây biểu hiện có mặt gen *Defensin* gen chuyển được khuếch đại tương ứng 480 bp. (hình 3.2)



Hình 3.3. Các kết quả kiểm tra bằng kỹ thuật PCR sự có mặt của gen *Defensin* trong các cây cà chua đã được chuyển gen

Điều này cho thấy rằng trong trường hợp này, khi gen *hpt* được chuyển vào cây chủ, đồng nghĩa với việc gen kháng *Defensin* cũng đã được chuyển. Trường hợp này việc chuyển gen đã xảy ra hoàn toàn, không có sự cố trong quá trình chuyển. Chúng tôi đã thu được 6 cây cà chua có mặt gen chuyển *Defensin*. 1 cây bị chết.

3.4. Kết quả chuyển gen *Chitinase* vào cà chua P375 và Pháp lùn

Quá trình biến nạp gen *Chitinase* (Dựa theo quy trình của Swapan K. Datta và cs. 1997, của Sung Park và cs, 2003 và N. Gorinova (2005).

3.4.1. Các kết quả nghiên cứu khả năng tái sinh của các giống sau khi biến nạp gen *Chitinase*

a. Ảnh hưởng của kháng sinh lên khả năng tái sinh của P375 và Pháp lùn

Sau khi biến nạp, mẫu được chuyển sang môi trường chọn lọc (môi trường tạo MS1 có bổ sung đồng thời 2 loại kháng sinh 250 mg/l *Cefotaxime* và 50 mg/l *Hygromycin*). Sau đó các mẫu được chọn lọc sẽ được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi có bổ sung đồng thời 2 loại kháng sinh *Cefotaxime* và *Hygromycin*.

Kết quả cho thấy giống như các quá trình chuyển gen trước, có 2 loại mô phát triển: (1) có những mô sẹo đã có cấu trúc chắc, màu trắng xanh hay trắng vàng, các mô mịn, sau nhiều lần cấy chuyển phát sinh chồi, (2) loại mô thứ 2 quan sát thấy chúng không có khả năng phát triển, hầu như bị đình trệ giống như các mẫu ở giống Balan hay H18 khi chuyển gen *Glucanase* và *Defensin*,

Từ các kết quả thí nghiệm đã thu được ở hai giống cà chua P375 và Pháp lùn lại một lần nữa khẳng định các loại kháng sinh (kháng sinh diệt vi khuẩn và kháng sinh chọn lọc) có ảnh hưởng ức chế sự sinh trưởng và phát triển cũng như làm giảm khả năng phát sinh cơ quan của tế bào và mô, dẫn đến làm giảm khả năng tái sinh sau biến nạp của cả 2 giống (bảng 3.5).

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy lên khả năng tái sinh

Các kết quả về tỷ lệ tái sinh của 2 giống P375 và Pháp lùn được trình bày ở bảng 3.5.

Sự ảnh hưởng của các nồng độ vi khuẩn lên khả năng tái sinh chồi rất rõ rệt: với công thức có nồng độ 1:15 (tương đương nồng độ vi khuẩn đo ở bước sóng 600

nm, OD=0,3) với thời gian đồng nuôi cấy trong 48 giờ cho tỷ lệ tái sinh cao nhất: giống P375 đạt **4,32%** (lá mầm) và **2,63%** (trụ lá mầm),

Quan sát các mô trên môi trường tái sinh có chứa kháng sinh ở nồng độ vi khuẩn 1:15, đồng nuôi cấy 48 tiếng cho thấy:

Đối với giống P375: Sau khi được cấy chuyển nhiều lần các *callus* sống sót đều phát triển rất khoẻ, đẹp, sinh đa phôi hoặc phát sinh chồi. Tuy nhiên có nhiều *callus* không có khả năng tái sinh, các mô không phát triển teo lại thâm đen và chết. *Đối với giống Pháp lùn:* Giống này cho tỷ lệ tái sinh chồi sau khi biến nạp thấp hơn so với giống P375. chúng quá nhạy cảm với các yếu tố môi trường đã trải qua (chủng vi khuẩn AHE 105 và kháng sinh *Hygromycin* và *Cefotaxime*).

3.4.2. Hiệu quả biến nạp *Chitinase* vào cà chua P375 và Pháp lùn

Các kết quả về hiệu quả biến nạp của 2 giống P375 và Pháp lùn được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Hiệu quả biến nạp gen với các nồng độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy khác nhau ở cà chua P375 và Pháp lùn.

Giống (Mẫu chuyển)	CT (Nồng độ VK)	Số mẫu thí nghiệm	Số chồi tái sinh sau sau đồng nuôi cấy			Tổng (chồi) mẫu tái sinh	Tỷ lệ tái sinh	Tổng chồi tái sinh sống sót	Hiệu suất chuyển (%)
			36 tiếng	48 tiếng	60 tiếng				
Giống P375									
Trụ lá mầm	1: 10	300	1	1	-	2	0,67	0	-
	1: 15	266	1	5	1	7	2,63	7	2,63
	1: 20	333	2	2	-	4	1,20	4	1,20
Lá mầm	1: 10	300	1	2	-	3	1,00	3	1,00
	1: 15	301	3	9	1	13	4,32	13	4,32
	1: 20	265	2	3	1	6	2,24	6	2,24
Tổng			8	22	3				
Giống Pháp lùn									
Trụ lá mầm	1: 10	279	-	1	-	1	0,36	1	0,36
	1: 15	276	-	4	2	6	2,17	6	2,17
	1: 20	282	1	3	1	5	1,77	4	1,42
Lá mầm	1: 10	279	1	3	1	5	1,79	4	1,43
	1: 15	285	2	6	2	10	3,51	8	2,81
	1: 20	288	1	3	1	5	1,74	5	1,74
Tổng			5	20	8				

Từ kết quả về hiệu quả biến nạp gen cho thấy, Giống P375 (2,63 (TLM) và 4,32 (LM) cho hiệu quả biến nạp cao hơn giống Pháp lùn 2,17 (TLM) và 3,51 (LM). Mẫu cấy là lá mầm cho tỷ lệ biến nạp cao hơn mẫu cấy là trụ lá mầm. Nồng

độ vi khuẩn ở độ hoà loãng 1:15 (tương đương nồng độ vi khuẩn đo ở bước sóng 600 nm, OD=0,3) với thời gian đồng nuôi cấy trong 48 giờ cho hiệu quả biến nạp cao nhất

Thí nghiệm thu được 21 cây hoàn chỉnh, trong đó có 16 cây thuộc giống P375 và 5 cây thuộc giống Pháp lùn, Nhưng trong quá trình cấy chuyển 9 cây đã bị chết (toàn bộ cây của giống Pháp lùn và 4 cây của giống P375) còn lại 12 cây hoàn chỉnh, khoẻ mạnh và được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *Chitinase*. Các cây được đánh số thứ tự CGcP375 1- CGcP375 12.

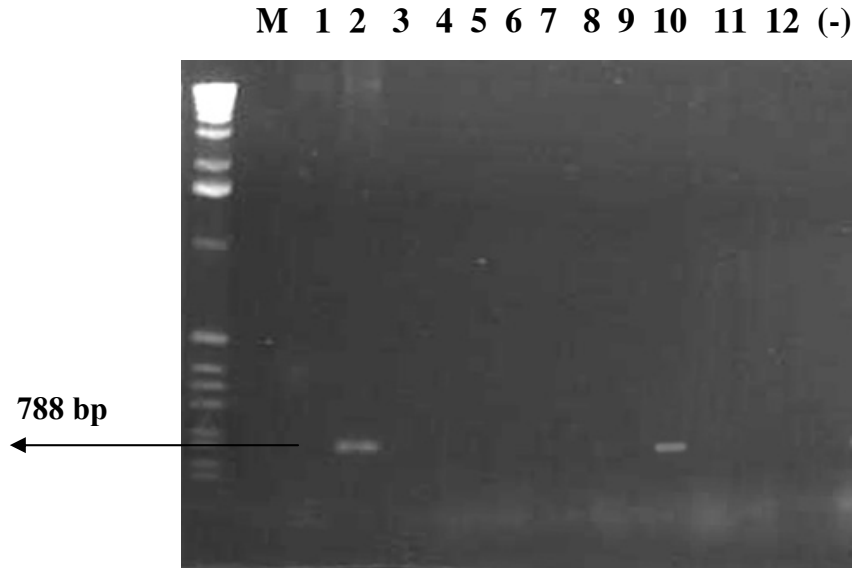
3.4.3. Kiểm tra sự có mặt tạm thời của gen chuyển

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR. Sử dụng thanh chuẩn 1 Kb với cặp mồi đặc trưng của gen *Chitinase* là:

CHI.F. 5'ATGGGGAAGAATAGGATGATG-3'

CHIR.5'GCCGACAGTGGTCCCAAAGAT-3'

Kết quả điện di cho thấy trong 12 cây cà chua thu được trên môi trường chọn lọc chỉ có 2 cây biểu hiện có mặt gen *Chitinase*, gen chuyển được khuếch đại tương ứng 788 bp. (hình 3.4)



Hình 3.4. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *chitinase* trong các cây đã được biến nạp gen

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Khả năng tạo *callus* và tái sinh cây phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy, mô nuôi và kiểu gen của cà chua. Dòng đại *L. pennelli* có khả năng tạo *callus* và tái sinh cây cao nhất. Giống H18 có tỷ lệ tạo chồi thấp nhất. Mô nuôi sử dụng trụ lá mầm cho hiệu quả cao nhất.

2. Sử dụng môi trường cơ bản MS để nuôi cấy *in vitro* với cà chua, thí nghiệm đã rút ra các môi trường hợp lý cho tạo *callus*, tạo chồi, nhân chồi và tạo cây hoàn chỉnh cụ thể như sau:

- Môi trường tạo *Callus*: MS (1962) + 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA) + 25g/l Sucrose + 7g/l agar; pH 5,7.

- Môi trường tạo chồi: MS (1962) + 2 mg/l Zeatin + 0,1 mg/l IAA + 25g/l Sucrose + 7g/l agar; pH 5,8

- Môi trường nhân chồi: MS (1962) + 2 mg/l Zeatin + 0,1 mg/l IAA + 25g/l Sucrose + 7g/l agar; pH 5,8

- Môi trường tạo cây hoàn chỉnh: MS (1962) + 2 mg/l Kinetin + 1 mg/l IAA + 25 g/l Sucrose + 5 g/l agar

3. Sử dụng hai chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 và Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 làm vật trung gian để chuyển gen đối với cà chua bước đầu thể hiện hiệu quả chuyển nạp tương đối tốt, có thể sử dụng chúng trong các nghiên cứu chuyển gen cho cà chua sau này.

4. Các giống cà chua khác nhau cho hiệu quả chuyển nạp không giống nhau: hai giống P375 và H18 có hiệu quả chuyển nạp cao, sau đó là giống Balan. Hai giống còn lại hiệu quả chuyển nạp không tốt: giống pháp lùn phản ứng với chủng vi khuẩn EHA105 còn dòng cà chua đại *L. pennelli* có phản ứng mạnh với cả hai chủng vi khuẩn EHA105 và LBA4404. Với hai giống này trong thí nghiệm của chúng tôi chưa thu được hiệu quả biến nạp.

5. Hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào nồng độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy. Thí nghiệm đã rút ra với cả 5 giống (dòng) khi đồng nuôi cấy với dịch huyền phù vi khuẩn trong thời gian 48 tiếng và chỉ số quang học $OD_{600\text{ nm}} = 0,3$ cho hiệu quả biến nạp cao nhất. Bên cạnh đó hai kháng sinh chọn lọc *Hygromycin* và *Kanamicine* có ảnh hưởng làm giảm khả năng tái sinh của các giống cà chua.

6. Kết quả đã thu được 9 cây cà chua tái sinh mang gen chuyển cụ thể: 1 cây cà chua thuộc giống Balan có mang gen chuyển *Glucanase*; 6 cây cà chua thuộc giống H18 mang gen chuyển *Defensin* và 2 cây cà chua thuộc giống P375 mang gen chuyển *Chitinase*. Sự có mặt của gen chuyển trên được kiểm tra bằng PCR.

Đề nghị

1. Các qui trình chuyển gen là những kết quả bước đầu, đề nghị có những nghiên cứu tiếp theo để có thể khẳng định đưa vào trong ứng dụng công nghệ chuyển gen trong quá trình tạo giống cà chua.
2. Tiếp tục đánh giá khả năng ứng dụng của các cây cà chua mang gen chuyển mà đề tài đã thu được.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

BÙI THỊ LAN HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN KHÁNG BỆNH NẤM
VÀO MỘT SỐ GIỐNG CÀ CHUA THÔNG QUA VI KHUẨN
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

**Chuyên ngành: Di truyền và chọn giống cây trồng
Mã số : 62 62 05 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

**Ng-êi h-íng d-ể:n : PGS. TS. L^a Th-á Anh Hằng
PGS.TS. Nguy-ê:n Hằng Minh**

HÀ NỘI - 2010

C«ng tr×nh h«m th«nh t'i:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI

Ng-êi h-íng dÉn khoa h«c:

- 1. PGS.TS. L^a ThĐ Ánh Hằng**
- 2 PGS.TS. NguyÔn Hằng Minh**

Ph¶n biÖn 1: PGS.TS. NguyÔn ThĐ Ng«c HuÖ
Trung t©m T¶i nguyªn th«c vÛt

Ph¶n biÖn 2: TS. §Æng Trng L-íng
ViÖn Di truyÖn n«ng nghiÖp

Ph¶n biÖn 3: PGS.TS. Ng« BÝch H¶o
Tr-êng §'i h«c N«ng nghiÖp Hµ Néi

LuËn ,n ®· ®-íc b¶o vÖ t'i hi ®ng chÊm luËn ,n cÊp Tr-êng hợp t'i:

Tr-êng §'i h«c N«ng nghiÖp Hµ Néi

Vµo hi 8h30', nguy 23 th,ng 11 n'm 2010

C thÓ t×m hiÓu luËn ,n t'i th- viÖn:

- **Th- viÖn Quốc gia ViÖt Nam**
- **Th- viÖn Tr-êng §'i h«c N«ng nghiÖp Hµ Néi**

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Bùi Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Trường, Lê Thu Hằng, Nguyễn Đức Doanh, Phan Tố Phượng, Nguyễn Hồng Minh, Lê Thị Ánh Hồng (2008), ” Một số kết quả nghiên cứu quy trình tái sinh cây cà chua phục vụ cho công tác chuyển gen”, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, số 6(222)/2008, trang 3-9.
2. Bùi Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Trường, Vũ Duy Thanh, Nguyễn Thị Kim Lý, Nguyễn Đức Doanh, Phan Tố Phượng, Nguyễn Hồng Minh, Lê Thị Ánh Hồng (2009), ”Nghiên cứu chuyển gen chitinase-Glucanase kháng nấm vào cây cà chua thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt nam*, số 1(10)/2009, trang 2-7.
3. Bùi Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Kim Lý, Lê Thị Ánh Hồng (2009), ”ứng dụng kỹ thuật DAS-ELISA để kiểm tra tình hình sức khỏe hạt cà chua trước khi đưa vào nuôi cấy In vitro *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, số 3(225)/2009, trang 33-40.