

B. KH & CN
VDTNN

B. KH & CN
VDTNN

**BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP
Đường Phạm Văn Đồng – Từ Liêm – Hà Nội**

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật Đề tài:

**“NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG TIN SINH HỌC ĐỂ QUẢN LÝ
AN TOÀN SINH HỌC SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN VÀ
SẢN PHẨM CỦA CHÚNG”**

TS. Đặng Trọng Lương

6817

24/4/2008

Hà Nội, 2007

Bản quyền 2007 thuộc Viện DTNN

*Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện
Di truyền Nông nghiệp, trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.*

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP
Đường Phạm Văn Đồng – Từ Liêm – Hà Nội**

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật Đề tài:

**“NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG TIN SINH HỌC ĐỂ QUẢN LÝ
AN TOÀN SINH HỌC SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN VÀ
SẢN PHẨM CỦA CHÚNG”**

TS. Đặng Trọng Lương

Hà Nội, 2007

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC.04-34

DANH SÁCH TÁC GIẢ CỦA ĐỀ TÀI KH & CN CẤP NHÀ NƯỚC

(Danh sách những cá nhân đã đóng góp sáng tạo chủ yếu cho Đề tài)

1. Tên đề tài: *Nghiên cứu áp dụng tin sinh học để quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng*
2. Thuộc chương trình: Nghiên cứu khoa học và phát triển Công nghệ Sinh học
3. Thời gian thực hiện: từ 1/2005 đến 6/2007
4. Cơ quan chủ trì: Viện Di truyền Nông nghiệp
Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
5. Bộ chủ quản: Bộ Khoa học và Công nghệ
6. Danh sách đội ngũ cán bộ tham gia thực hiện đề tài:

<i>Họ và tên</i>	<i>Cơ quan công tác</i>	<i>Số tháng làm việc cho đề tài</i>
<i>A. Chủ nhiệm đề tài:</i> TS. Đặng Trọng Lương	Viện Di truyền Nông nghiệp	30 tháng
<i>B. Cán bộ nghiên cứu:</i> 1. PGS. TS Vũ Đức Quang 2. TS. Nguyễn Duy Bình 3. TS. Lã Tuấn Nghĩa 4. CN. Nguyễn Trịnh Toàn 5. TS. Nguyễn H. Minh Quyền 6. TS. Lê Như Kiều 7. Th.S Khuất Hữu Trung 8. Th.S Nguyễn Phương Đoàn 9. Th.S Nguyễn Thúy Diệp 10. KS. Nguyễn Trường Khoa 11. KS. Lê Thanh Loan 12. KS. Kiều Thị Dung 11. TS. Trần Thị Cúc Hoà 12. Th.S Trần Như Long	Viện DTNN PV Khí tượng TV và MT Viện DTNN Viện DTNN TT Công Nghệ SH - ĐHQG Viện DTNN Viện DTNN Viện DTNN Viện DTNN Viện DTNN Viện DTNN Viện DTNN Viện Lúa ĐB Sông Cửu Long Công ty Đầu tư PT Công nghệ tin học (TECKEY JSC)	18 tháng 12 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 9 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 18 tháng 12 tháng

BÀI TÓM TẮT

Mục tiêu của đề tài: “*Nghiên cứu áp dụng tin sinh học để quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng*” là thu thập thông tin và nhận biết sinh vật biến đổi gen (GMOs) và sản phẩm của chúng. Từ đó xây dựng cơ sở dữ liệu về GMOs, thiết kế xây dựng trang Website. Xây dựng và đề xuất được giải pháp quản lý về GMOs và sản phẩm của chúng và biện pháp thực hiện, cảnh báo về tiềm ẩn rủi ro (nếu có). Đề tài cũng ứng dụng tin sinh học để phục vụ công tác thu thập và xây dựng bản đồ chỉ thị phân tử các gen có liên quan đến tính trạng quan trọng của cây lúa.

Phương pháp nghiên cứu: Chúng tôi đã ứng dụng công nghệ thông tin, tin học, công nghệ sinh học, sinh học phân tử, các phương pháp lai giống truyền thống,... trong quá trình nghiên cứu để thực hiện đề tài.

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các sinh vật biến đổi gen (bao gồm: thực vật, động vật, vi sinh vật và sản phẩm hạt, thức ăn chăn nuôi), các giống lúa dự chiêm và LC93-1.

Kết quả nổi bật và tính mới của đề tài:

1. Thu thập được các thông tin về các cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen và thức ăn gia súc có chứa GMOs. Đã thu thập được các dữ liệu liên quan đến cấu trúc gen đã được chuyển vào trong các sinh vật biến đổi gen.
2. Xây dựng được phần mềm quản lý cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng. Từ đó xây dựng website: <http://www.gmo.gov.vn> chứa đựng thông tin liên quan đến sinh vật biến đổi gen.
3. Tối ưu hoá được ba phương pháp để nhận biết GMOs (PCR, lai ADN, que thử ELISA). Xác định được các trình tự motif đặc trưng của PCR phát hiện đoạn *CaMV 35S*, *T-NOS*, gen *Bt*; cũng như mẫu dò và bộ kit để nhận biết cây trồng biến đổi gen. Phát hiện được một số dạng thức ăn gia súc hiện đang lưu hành trên thị trường có chứa sản phẩm của cây trồng biến đổi gen.
4. Xây dựng bản đồ chỉ thị phân tử các gen liên quan đến bệnh đạo ôn ở lúa dự chiêm và gen chịu hạn ở lúa LC93-1.
5. Đã đề xuất được biện pháp quản lý một số đối tượng cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen.
6. Đào tạo 1 cử nhân Công nghệ sinh học và đã xuất bản được 3 bài báo.

LỜI CẢM ƠN

Với sự nỗ lực, sáng tạo trong nghiên cứu của Chủ nhiệm đề tài và các cán bộ tham gia đề tài, Đề tài KC.04-34 đã hoàn thành đúng tiến độ của thuyết minh ban đầu. Ngoài ra, không thể không kể đến sự quan tâm, giúp đỡ, tạo điều kiện của các cơ quan, tổ chức, các viện nghiên cứu, các trường đại học và các nhà khoa học Việt Nam.

Vì vậy chúng tôi, xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và PTNT, Ban Chủ nhiệm Chương trình KC.04 đã tạo điều kiện giúp đỡ Ban thực hiện đề tài KC.04-34 về mặt chỉ đạo, quản lý, ngân sách.

Chúng tôi cũng xin trân trọng cảm ơn:

- Viện Di truyền Nông nghiệp.
- Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long.
- Phân Viện Khí tượng Thủy văn và Môi trường, TP.HCM.
- Công ty Cổ phần đầu tư và phát triển Công nghệ (TECKEY JSC).

Cùng với các đơn vị như: Viện Chăn nuôi, Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Quan Trắc và Dữ liệu Môi trường, Cục bảo vệ Môi trường, Trung tâm Công nghệ Sinh học - ĐHQG Hà Nội, Trường ĐHN Nông nghiệp I, đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi trong nghiên cứu khoa học, công nghệ và cập nhật các kết quả khoa học hiện có tại Việt Nam.

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT

aad: *aldehyde alcohol dehydrogenase*

ADN: *Axit deoxyribonucleic*

cADN: *Axit deoxyribonucleic bổ trợ*

ALS: *Enzym Acetolactate synthase*

ARN: *Axit Ribonucleic*

bla: *beta-galactosidase*

Bt: *Bacillus thuringensis*

CaMV: *Virút khảm súp lơ (Cauliflower mosaic virus)*

CDPK: *Calcium-dependent protein kinase*

cM: *Centimorgan*

CP4 EPSPS: *5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*

CS: *Cộng sự*

CSDL: *Cơ sở dữ liệu*

ECB: *European Corn Borer (Sâu đục thân ngô Châu Âu)*

ELISA: *Enzyme linked immunosorbant assay (Phân tích chất hấp phụ miễn dịch gắn kết enzym)*

FDA: *Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ*

GM: *Biến đổi di truyền (Biến đổi gen)*

GMCs: *Cây trồng biến đổi gen (Genetically Modified Crops)*

GMMs: *Vi sinh vật biến đổi gen (Genetically Modified Microorganisms)*

GMOs: *Sinh vật biến đổi gen (Genetically Modified Organisms)*

GmFad 2-1: *delta-12 Desaturase*

gox: *Glyphosate oxidoreductase*

GS: *Gen Glutamine synthetase*

GUS: *β -D-Glucuronidase*

HPLC: *Sắc ký lỏng cao áp*

NIR: *Phổ hồng ngoại gần (Near infrared spectroscopy)*

T-NOS: *Terrminator Nopaline synthase*

nptII: *Neomycin phosphotransferase*

mARN: *ARN thông tin*

PAT hay bar: *phosphinothricin-N-acetyltransferase*

PCR: *Phản ứng trùng hợp (Polymerase Chain Reaction)*

PCB: *Chlorinated polychlorinated biphenyls*

pmi: *Phosphomannose isomerase*

QC-PCR: *Quantitative competitive Polymerase Chain Reaction (PCR cạnh tranh định lượng)*

QTL: *Quantitative trait loci*

rBGH: *Hormon sinh trưởng*

SQL: *Structured Query Language (Ngôn ngữ vấn đáp do IBM soạn thảo được sử dụng rộng rãi trong hệ thống máy tính)*

SSR: *Simple Sequence Repeat*

TCE: *Trichloroethylene*

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. KHÁI NIỆM VỀ GMO	6
1.2. TÌNH HÌNH THƯƠNG MẠI HOÁ SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN	6
1.2.1. Tình hình nghiên cứu và thương mại hoá cây trồng biến đổi gen	6
1.2.2. Thực trạng nghiên cứu động vật biến đổi gen	12
1.2.3. Thực trạng nghiên cứu vi sinh vật biến đổi gen	14
1.3. VẤN ĐỀ AN TOÀN VÀ RỦI RO CỦA SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN	15
1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH GMOs	19
1.4.1. Phương pháp xác định dựa trên cơ sở ADN	19
1.4.1.1. Kỹ thuật PCR định tính	19
1.4.1.2. PCR điểm cuối định lượng (Quantitative End-point PCR)	20
1.4.1.3. PCR định lượng xử lý số liệu thông qua máy tính (Quantitative Real-time PCR)	21
1.4.1.4. Kỹ thuật Southern Blot	24
1.4.2. Kỹ thuật nhận biết GMOs dựa trên cơ sở protein	25
1.4.2.1. Kỹ thuật phân tích ELISA	25
1.4.2.2. Kỹ thuật dải chảy bên	26
1.4.2.3. Kỹ thuật Western blot	26
1.4.3. Nhận biết GMOs theo tỷ lệ nhỏ	27
1.5. TỔNG QUAN VỀ THIẾT KẾ MÔI, MẪU DÒ ĐỂ NHẬN BIẾT GMOs..	27
1.6. XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU VÀ THIẾT KẾ PHẦN MỀM	29
1.6.1. Phân loại cơ sở dữ liệu	29
1.6.2. Tổng quan về vấn đề xây dựng cơ sở dữ liệu và thiết kế phần mềm	30
1.6.3. Tổng quan về nghiên cứu và sự phát triển của mạng Web và CSDL	33
1.7. ỨNG DỤNG TIN SINH HỌC ĐỂ GIẢI TRÌNH TỰ GEN	34
1.8. TỔNG QUAN VỀ LẬP BẢN ĐỒ GEN LÚA	35
1.8.1. Sử dụng SSR trong lập bản đồ gen lúa	35
1.8.2. Tình hình nghiên cứu lập bản đồ gen kháng đạo ôn	36
1.8.3. Tình hình nghiên cứu lập bản đồ gen chịu hạn	37

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	40
2.1.1. Các dòng, giống sử dụng trong nghiên cứu	40
2.1.2. Các gen sử dụng trong thiết kế các cặp môi và mẫu dò	40
2.1.3. Các cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR và các bộ kit nhận biết GMOs	40
2.1.4. Các phần mềm sử dụng trong nghiên cứu và xây dựng Web	41
2.2. HOÁ CHẤT	42
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU	44
2.3.1. Xây dựng cơ sở dữ liệu và thiết kế phần mềm	47
2.3.2. Thiết kế môi PCR, thiết kế mẫu dò cho việc phát hiện một số gen phổ biến được chuyển vào cây trồng	48
2.3.2.1. Thiết kế và kiểm tra môi	48
2.3.2.2. Thiết kế mẫu dò	48
2.3.3. Phương pháp phát hiện GMOs	49
2.3.3.1. Phương pháp tách chiết ADN	49
2.3.3.2. Phản ứng PCR	50
2.3.3.3. Xác định GMOs bằng que thử miễn dịch ELISA	53
2.3.3.4. Xác định GMOs nhờ kỹ thuật lai phân tử ADN (Southern blot)	54
2.3.4. Giải trình tự một số gen đã được sử dụng trong biến nạp GMOs	55
2.3.5. Ứng dụng tin sinh học để lập bản đồ chỉ thị phân tử các gen có liên quan đến bệnh đạo ôn ở lúa Dực chiêm và tính trạng kháng hạn ở lúa LC93-1	56
2.3.5.1. Lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dực chiêm.....	56
2.3.5.2. Lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa LC93-1.....	57
2.4. MÁY MÓC THIẾT BỊ	57
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	59
3.1. KẾT QUẢ THU THẬP THÔNG TIN VỀ SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN ...	59
3.1.1. Thông tin về một số cây trồng biến đổi gen	59
3.1.1.1. Đậu tương biến đổi gen	59
3.1.1.2. Các dòng ngô biến đổi gen	65
3.1.1.3. Dòng cà chua chuyển gen FLAVR SAVR™	78
3.1.1.4. Một số dòng Bông (<i>Gossypium hirsutum</i> L) chuyển gen	79

3.1.1.5. Dòng Cải dầu (<i>Brassica napus</i>) chuyển gen	81
3.1.1.6. Dòng Rau diếp xoăn (<i>Chichorium intybus</i>) chuyển gen	82
3.1.1.7. Một số dòng Lúa (<i>Oryza sativa</i>) chuyển gen	84
3.1.1.8. Một số dòng Lúa chuyển gen ở Việt Nam	103
3.1.1.9. Thông tin về thực phẩm biến đổi gen	106
3.1.2. Thông tin về thức ăn gia súc có nguồn gốc từ cây trồng biến đổi gen	124
3.1.2.1. Sản phẩm GMC có trong thức ăn gia súc	124
3.1.2.2. Tính an toàn của sản phẩm thức ăn gia súc có nguồn gốc từ GMCs ...	126
3.1.2.3. Sự phân bố và thương mại hoá của các sản phẩm thức ăn gia súc có nguồn gốc từ GMCs	127
3.1.3. Thông tin về một số vi sinh vật biến đổi gen	129
3.1.3.1. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng để làm thuốc bảo vệ thực vật..	129
3.1.3.2. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong xử lý môi trường	130
3.1.3.3. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong công nghệ thực phẩm ..	132
3.1.3.4. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong y tế	133
3.1.4. Thông tin chung về động vật chuyển gen	136
3.1.4.1. Thông tin về cá chuyển gen	136
3.1.4.2. Thông tin về bò chuyển gen	139
3.1.4.3. Thông tin về lợn chuyển gen	141
3.1.4.4. Động vật chuyển gen và ứng dụng của chúng trong dược phẩm	144
3.1.4.5. Thông tin tóm tắt về động vật chuyển gen trên thế giới.....	146
3.1.5. Thông tin về các gen được chuyển vào trong một số cây trồng	150
3.2. THIẾT KẾ MÔI PCR, THIẾT KẾ MẪU DÒ ĐỂ NHẬN BIẾT MỘT SỐ GEN PHỔ BIẾN ĐƯỢC CHUYỂN VÀO CÂY TRỒNG	153
3.3. SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR VỚI CÁC MÔI ĐẶC HIỆU ĐỂ NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI GEN	156
3.3.1. Kết quả tách chiết ADN	156
3.3.2. Kết quả nhận biết cây trồng biến đổi gen và sản phẩm thức ăn gia súc nhờ phản ứng PCR thông thường	158
3.3.2.1. Kết quả nhận biết đoạn promoter CaMV 35S	158
3.3.2.2. Kết quả nhận biết đoạn terminator NOS	160
3.3.2.3. Kết quả phát hiện một số đoạn đặc trưng trong gen CryIA(b)	161

3.3.2.4. Kết quả nhận biết một trong số các gen kháng thuốc trừ cỏ của cây trồng biến đổi gen	163
3.3.3. Kết quả nhận biết cây trồng biến đổi gen nhờ phản ứng multiplex-PCR và Realtime-PCR	165
3.3.3.1. Phát hiện GMCs nhờ phản ứng multiplex-PCR	165
3.3.3.2. Phát hiện GMCs nhờ phản ứng Real-time PCR	168
3.4. NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN NHỜ KỸ THUẬT LAI ADN (SOUTHERN BLOT)	173
3.5. KẾT QUẢ NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI GEN NHỜ SỬ DỤNG QUE THỬ NHANH (QuickStix)	175
3.6. KẾT QUẢ ĐỌC TRÌNH TỰ MỘT SỐ GEN ĐÃ ĐƯỢC BIẾN NẠP VÀO GMOs	179
3.7. KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THIẾT KẾ PHẦN MỀM CHUYÊN BIỆT ĐỂ QUẢN LÝ GMOs	180
3.7.1. Phần mềm quản lý GMOs	180
3.7.2. Website cung cấp thông tin về GMOs	183
3.8. CÁC GIẢI PHÁP QUẢN LÝ MỘT SỐ SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN CÓ TRIỂN VỌNG VÀ CẢNH BÁO NHỮNG RỦI RO TIỀM ẨN	191
3.8.1. Đánh giá nguy cơ tiềm ẩn của cây chuyển gen dựa vào cấu trúc phân tử	192
3.8.2. Đánh giá nguy cơ tiềm ẩn của cây chuyển gen dựa vào đặc điểm hình thái	201
3.8.3. Ví dụ về việc đánh giá mối nguy cơ tiềm ẩn khi ứng dụng chủng <i>E. coli</i> chuyển gen	202
3.9. KẾT QUẢ ỨNG DỤNG TIN SINH HỌC ĐỂ LẬP BẢN ĐỒ CHỈ THỊ PHÂN TỬ CỦA GEN LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH ĐẠO ÔN VÀ GEN CHỊU HẠN Ở LÚA	205
3.9.1. Kết quả nghiên cứu lập bản đồ gen kháng đạo ôn ở Lúa Dự chiêm	205
3.9.1.1. Đánh giá phản ứng bệnh	207
3.9.1.2. Xây dựng bản đồ liên kết	209
3.9.1.3. Phân tích xác định gen (QTL)	211
3.9.2. Kết quả nghiên cứu lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa LC 93-1	215
3.9.2.1. Đánh giá khả năng chịu hạn	216

3.9.2.2. <i>Xây dựng bản đồ liên kết</i>	219
3.9.2.3. <i>Phân tích xác định QTL</i>	222
CHƯƠNG 4: TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC ...	227
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	229
TÀI LIỆU THAM KHẢO	231
PHỤ LỤC A: QUY TRÌNH NHẬN BIẾT GMOs	i1
PHỤ LỤC B: MỘT SỐ PLASMID SỬ DỤNG TRONG CHUYỂN GEN THỰC VẬT	i6
PHỤ LỤC C: CÁC GIỐNG LÚA GM TRÊN THẾ GIỚI	i19
PHỤ LỤC D: DANH SÁCH CÁC SẢN PHẨM CHUYỂN GEN ĐÃ ĐƯỢC ĐÁNH GIÁ AN TOÀN	i58
PHỤ LỤC E: CÁC DÒNG VI SINH VẬT ĐÃ CHUYỂN GEN TRÊN THẾ GIỚI	i62
PHỤ LỤC F: MỘT SỐ TRANG WEBSITE VỀ GMOs	i64
PHỤ LỤC G: MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ HỘI THẢO KHOA HỌC “CƠ SỞ DỮ LIỆU SINH HỌC BIẾN ĐỔI GEN VÀ QUẢN LÝ AN TOÀN SINH HỌC ”- HÀ NỘI, 19/11/2006	i68

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
Bảng 1	Diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu năm 2005 phân theo nước	8
Bảng 2	Trình tự các cặp môi dùng trong phản ứng PCR thông thường	40
Bảng 3	Trình tự các cặp môi dùng trong phản ứng RT-PCR và multiplex-PCR	41
Bảng 4	Một số gen hữu dụng trong nghiên cứu chuyển nạp gen ở lúa	87
Bảng 5	Một số cây trồng biến đổi gen được cấp phép dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc	107
Bảng 6	Một số chất phụ gia dùng trong thực phẩm có nguồn gốc từ GMOs	121
Bảng 7	Một số enzyme từ vi sinh vật biến đổi gen được dùng trong sản xuất thực phẩm	123
Bảng 8	Các thông tin liên quan đến sản phẩm GMCs có trong thức ăn gia súc	124
Bảng 9	Tóm tắt về mức độ không ảnh hưởng đã quan sát dựa trên các nghiên cứu về tính độc đối với các protein mới đã biểu hiện trong GMCs	126
Bảng 10	Độ bền vững của các protein đã đưa vào để tiêu hoá trong dịch vị	127
Bảng 11	Sự thương mại hoá của các sản phẩm thức ăn gia súc có chứa GMCs	127
Bảng 12	Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng để làm thuốc bảo vệ thực vật	129
Bảng 13	Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong xử lý môi trường	130
Bảng 14	Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong công nghệ thực phẩm	132
Bảng 15	Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong y tế	133
Bảng 16	Một số loài cá đã được chuyển gen	136

Bảng 17	Thông tin về một số gen đã được chuyển vào lợn	142
Bảng 18	Các loại dược phẩm được sử dụng gần đây có nguồn gốc từ động vật chuyển gen	144
Bảng 19	Giá một số sản phẩm thuốc được tạo ra bởi công ty ‘Animal Pharming’	146
Bảng 20	Danh sách các loài động vật chuyển gen trên thế giới	146
Bảng 21	Một số loại cây trồng biến đổi gen đang được thương mại hoá	150
Bảng 22	Thông tin về các gen đã chuyển vào cây trồng biến đổi gen đang được thương mại hoá	151
Bảng 23	Trình tự một số môi PCR đã thiết kế để nhận biết GMOs	155
Bảng 24	Sự phát hiện <i>CaMV 35S</i> trong ADN từ bột ngô và bột đậu tương	172
Bảng 25	Một số cây trồng chuyển gen được nhận biết nhờ que thử QuickStix (EnviroLogix)	177
Bảng 26	Phản ứng bệnh của một số giống lúa với các chủng đạo ôn có độc tính cao	208
Bảng 27	Đánh giá phản ứng bệnh của các giống lúa Dự chiêm, CR203 và các cây lúa F2 với nấm bệnh đạo ôn	208
Bảng 28	Chỉ thị SSR cho đa hình giữa giống Dự chiêm và CR203 được sử dụng để nhận dạng ADN ở các cây F2 và xác định gen/QTL kháng đạo ôn	210
Bảng 29	Các QTL được phát hiện liên quan đến tính kháng đạo ôn lá	211
Bảng 30	Kết quả đánh giá tính chịu hạn thông qua chỉ số LDS sau 7 ngày tạo hạn đối với cây lúa bố mẹ (Khang dân 18, LC93-3) và F2	217
Bảng 31	Kết quả đánh giá tính chịu hạn thông qua chỉ số DLR sau khi tạo hạn đối với cây lúa bố mẹ (Khang dân 18, LC93-3) và F2	218
Bảng 32	Các chỉ thị SSR cho đa hình ADN giữa hai giống lúa Khang dân 18 và LC93-1 được sử dụng để lập bản đồ gen chịu hạn	219
Bảng 33	Các QTL được phát hiện liên quan đến độ cuộn lá	223
Bảng 34	Các QTL được phát hiện liên quan ngày cuộn lá hoàn toàn	224

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
Hình 1	Sự nhận biết sản phẩm PCR trong Real time-PCR	22
Hình 2	Sự khuếch đại gen epsps trong dung dịch ADN plasmid pha loãng 7 lần mà có chứa gen epsps, sử dụng hệ thống nhận biết ABI Prism [®] 7700 Sequence	24
Hình 3	Phương pháp phân tích dải chảy bên	25
Hình 4	Cấu trúc PV-GMGT04 được sử dụng trong biến nạp dòng GTS40-3-2	59
Hình 5	Cấu trúc pB2/35SacK sử dụng trong biến nạp các dòng A2704-12, A2704-21, A5547-35	60
Hình 6	Cấu trúc pWRG2114 sử dụng trong biến nạp các dòng W62, W98	60
Hình 7	Hai cấu trúc plasmid pBS43 (A) và pML102 (B) sử dụng để biến nạp các dòng đậu tương G94-1, G94-19, G168	62
Hình 8	Cấu trúc PHP 6710 sử dụng trong biến nạp các dòng ngô 676, 678, 680	65
Hình 9	Cấu trúc pZO1502 sử dụng trong biến nạp dòng Bt11	66
Hình 10	Cấu trúc pDPG165 sử dụng trong biến nạp dòng Bt16	68
Hình 11	Cấu trúc pCIB4431 (apUC- xuất phát từ plasmid)	68
Hình 12	Cấu trúc pCIB3064 (bắt nguồn từ plasmid apUC)	68
Hình 13	Cấu trúc pRVA9909 sử dụng trong biến nạp dòng CBH-351	69
Hình 14	Cấu trúc pDE110 sử dụng trong biến nạp dòng CBH-351	69
Hình 15	Cấu trúc pDPG165 sử dụng trong biến nạp dòng DBT418	70
Hình 16	Cấu trúc pDPG320 sử dụng trong biến nạp dòng DBT418	70
Hình 17	Cấu trúc pDPG434 sử dụng trong biến nạp để tạo ra dòng GA21	71
Hình 18	Cấu trúc PV-ZMBK07 (Mon832)	72
Hình 19	Cấu trúc PV-ZMGT10 (Mon832)	72
Hình 20	Cấu trúc PV-ZMBK15	73
Hình 21	Cấu trúc PV-ZMIR13L sử dụng trong biến nạp dòng Mon 863	74
Hình 22	Plasmid pVE108 được sử dụng để biến nạp tạo ra dòng MS3	75
Hình 23	Cấu trúc plasmid PV-ZMGT32L đã được sử dụng để tạo ra dòng NK603	75
Hình 24	Plasmid p35S/Ac đã được sử dụng để tạo ra dòng T14, T25	76
Hình 25	Plasmid PHI8999A đã được sử dụng để tạo ra dòng TC1507	77

Hình 26	Cấu trúc pMH26 sử dụng trong biến nạp dòng 19-51A	80
Hình 27	Cấu trúc plasmid pTTM8RE sử dụng trong biến nạp các dòng RM3-3, RM3-4 và RM3-6	84
Hình 28	Cấu trúc Plasmid pB5/35Sbar được sử dụng để tạo dòng LLRICE06 và LLRICE62	85
Hình 29	Các gen được chuyển vào cây trồng biến đổi gen thương mại hoá	153
Hình 30	Minh hoạ một số bước trong thiết kế môi nhận biết đoạn <i>CaMV 35S</i>	154
Hình 31	Kết quả tách chiết ADN của các giống ngô, bông, đậu tương, khoai lang chuyển gen và thức ăn gia súc	157
Hình 32	Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi 35S1/35S2 của ngô (A), đậu tương (B), khoai lang (C), bông (D), thức ăn gia súc (E), mẫu trộn lẫn sản phẩm chuyển gen và không chuyển gen (2F)	159
Hình 33	Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi NOS-F/NOS-R của ngô (A) và khoai lang (B)	160
Hình 34	Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi CDPK-cry03/CDPK-cry04 nhận biết ngô Bt, thức ăn gia súc có chứa GMC mang gen <i>Bt</i> (A) và cặp môi HS01/Cry-CR01 nhận biết bông Bt (B)	162
Hình 35	Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi PA01/CM01 (A, B) và PA01/CM03(C) phát hiện gen <i>PAT</i> của các mẫu ngô, thức ăn gia súc	164
Hình 36	Kết quả điện di sản phẩm của multiplex PCR và PCR đơn đối với gen <i>Bt</i> và <i>PAT</i>	166
Hình 37	Trình tự và sự chuyển dịch peptid của đơn vị sao chép được khuếch đại từ cặp môi 1F/1R tương ứng với đoạn gen <i>Bt</i> có trong dòng ngô Mon810	167
Hình 38	Phản ứng multiplex PCR của các đoạn <i>EPSPS</i> và <i>T-NOS</i> có mặt trong đậu tương Roundup Ready	168
Hình 39	Real time PCR của đoạn <i>T-NOS</i> từ đậu tương Roundup Ready, sử dụng TaqMan	168
Hình 40	Đánh giá chất lượng ADN đã tách chiết	170
Hình 41	Kết quả xử lý enzym (A) và lai phân tử ADN nhận biết gen <i>Cry IA(c)</i> trong cây ngô chuyển gen (B)	174
Hình 42	Kết quả nhận biết protein <i>CryIAb</i> (A) và <i>CryIAc</i> (B) có trong giống ngô Bt nhờ sử dụng que thử nhanh	175

Hình 43	Kết quả biểu hiện của protein <i>EPSPS</i> trong đậu tương Roundup Ready nhờ sử dụng que thử nhanh	176
Hình 44	Thí nghiệm nhận biết GMOs nhờ sử dụng kỹ thuật que thử miễn dịch ELISA	176
Hình 45	Trình tự đặc trưng của đoạn <i>CaMV 35S</i>	179
Hình 46	Trình tự đặc trưng của đoạn <i>T-NOS</i>	180
Hình 47	Trình tự đặc trưng của gen <i>Bt</i>	180
Hình 48	Cấu trúc tổng thể của CSDL GMOs và các thành phần dữ liệu	181
Hình 49	Giao diện chỉnh sửa dữ liệu thông tin chung	182
Hình 50	Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về đặc điểm của dòng	182
Hình 51	Giao diện tìm kiếm dữ liệu cơ bản	182
Hình 52	Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về loài	183
Hình 53	Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về tính trạng	183
Hình 54	Trang chủ	185
Hình 55	Cơ sở dữ liệu GMOs	185
Hình 56	Phản ứng bệnh đạo ôn của các giống lúa Dự chiêm, CR203 và các cây F2 được đánh giá theo thang điểm của IRRI	207
Hình 57	Nhận dạng ADN để xác định sự đa hình giữa hai giống lúa Dự chiêm và CR203 bằng các cặp mồi SSR khác nhau	212
Hình 58	Nhận dạng ADN của những cây lúa bố mẹ và F2 với mồi SSR cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ	213
Hình 59	Bản đồ liên kết chỉ thị phân tử SSR và các QTL kháng đạo ôn được xác định qua phân tích quần thể F2 của tổ hợp lai giữa giống lúa Dự chiêm và CR203	214
Hình 60	Thế hệ F2 sau khi bị gây khô hạn	216
Hình 61	Khả năng chịu hạn về chỉ số độ cuộn lá của các cây lúa F2	217
Hình 62	Nhận dạng ADN để xác định sự đa hình giữa hai giống lúa Dự chiêm và CR203 bằng các cặp mồi SSR khác nhau	221
Hình 63	Nhận dạng ADN của những cây lúa bố mẹ và F2 với mồi SSR cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ	221
Hình 64	Bản đồ liên kết giữa các chỉ thị SSR và 12 QTL đã được phát hiện liên quan đến khả năng chịu hạn	226

MỞ ĐẦU

Kể từ khi Công nghệ Sinh học trở thành ngành công nghệ mũi nhọn thì các cuộc “chạy đua tốc độ” giữa các quốc gia đã ngầm diễn ra trên thế giới. Công nghệ sinh học đã được đưa vào chương trình hợp tác quốc tế trong Hội đồng tương trợ quốc tế. Liên hợp quốc đã thành lập trung tâm quốc tế về công nghệ sinh học và công nghệ gen, trong đó Việt Nam là một thành viên.

Cùng với sự phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học, công nghệ gen đã mở ra chân trời mới, chứa đựng một tương lai đầy hứa hẹn về cải tiến cây trồng, vật nuôi và vi sinh vật. Công nghệ gen đã tạo ra nhiều giống cây trồng, vật nuôi và vi sinh vật biến đổi gen mang các tính trạng ưu việt mà tự nhiên không có được như tăng năng suất, tạo mùi thơm, tăng hàm lượng axit amin,... Từ đó giúp cải thiện năng suất, chất lượng,... và cải thiện môi trường.

Ngày nay, GMOs và sản phẩm của chúng đã và đang được thương mại hoá rộng rãi ở nhiều quốc gia theo con đường chính thống và không chính thống. Ở Việt Nam, sự phát triển của công nghệ gen cũng đã tạo ra được một số giống cây trồng, vật nuôi và vi sinh vật chuyển gen. Trong khi tất cả các sản phẩm khoa học này đều được các nhà khoa học Việt Nam quản lý chặt chẽ trong phòng thí nghiệm, nhưng có một số sản phẩm GMOs của các công ty xuyên Quốc gia du nhập vào nước ta theo con đường không chính thống lại đang được trồng trên đồng ruộng hoặc bán trên thị trường mà không có sự quản lý, giám sát của nhà nước.

Mặc dù những lợi ích mà GMOs đem lại cho nhân loại là rất lớn nhưng mỗi lo ngại về những rủi ro tiềm ẩn của các sản phẩm chuyển gen này vẫn đang tồn tại. Vì vậy 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 mặt dinh dưỡng, độc tính, khả năng gây dị ứng và các khía cạnh khoa học thực phẩm khác. Những đánh giá về an toàn thực phẩm này dựa trên những quy định của từng nước. Chúng bao gồm: một hướng dẫn sử dụng sản

phẩm; một thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm; các thông tin về phân tử, hoá sinh, độc tính, dinh dưỡng, và khả năng gây dị ứng...

Quản lý an toàn sinh học là thước đo của sự thành công bởi lẽ khi ta có trong tay một hệ thống an toàn sinh học có hiệu quả thì nó sẽ thúc đẩy việc sử dụng công nghệ sinh học để cải tiến năng suất cây trồng và chất lượng thực phẩm, đảm bảo các lợi ích về kinh tế, cũng như bảo vệ sức khoẻ con người và môi trường. Vì vậy việc quản lý và đề ra khung pháp lý để kiểm soát các sản phẩm GMOs này là cần thiết. Nhiều quốc gia đã có những quy định đối với vấn đề quản lý và sử dụng GMOs, và vấn đề dán nhãn sản phẩm biến đổi gen đã và đang là một trong những yêu cầu bắt buộc ở một số quốc gia.

Việt Nam cũng đã ban hành “Quy chế quản lý an toàn các sinh vật đã biến đổi gen và sản phẩm của chúng”. Yêu cầu quan trọng của quy chế đưa ra là các đối tượng tham gia nghiên cứu, phát triển công nghệ về sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng phải được giữ gìn, bảo quản an toàn, không để thất thoát các sinh vật biến đổi gen và các vật liệu có liên quan nguy hiểm khác ra ngoài môi trường. Quy chế cũng yêu cầu phải dán nhãn đối với các sản phẩm GMOs nhập khẩu.

Hiện nay, Bộ Tài nguyên và Môi trường là cơ quan đầu mối của chính phủ trong việc quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc từ GMOs. Bộ Khoa học Công nghệ chịu trách nhiệm quản lý nhà nước về nghiên cứu khoa học, phát triển công nghệ đối với các sinh vật biến đổi gen. Một số Bộ khác như Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Bộ Y tế, Bộ Công nghiệp, Bộ Thủy sản có nhiệm vụ quản lý nhà nước về an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen thuộc lĩnh vực phụ trách.

Để góp phần trong việc quản lý GMOs, Viện Di truyền Nông nghiệp đã tiến hành nghiên cứu đề tài: “**Nghiên cứu áp dụng tin sinh học để quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng**”. Đề tài này bao gồm những nội dung chính sau:

- Thu thập dữ liệu về sinh vật biến đổi gen bao gồm: cây trồng, động vật, vi sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng (sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc);
- Xử lý, phân tích dữ liệu, thiết kế cơ sở dữ liệu, phần mềm chuyên biệt để quản lý cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có chứa GMOs;
- Phát hiện GMOs nhờ kỹ thuật PCR, lai phân tử ADN, nhận biết protein của gen *Bt*, *EPSPS* ở ngô, bông, đậu tương, lúa và sản phẩm thức ăn gia súc;

- Ứng dụng tin sinh học để lập bản đồ chỉ thị phân tử các gen liên quan đến bệnh đạo ôn ở lúa Dự chiêm và gen chịu hạn ở lúa LC93-1;
- Đề xuất giải pháp quản lý các sinh vật biến đổi gen có triển vọng và cảnh báo những gen chuyển có tiềm ẩn rủi ro.

CÁC THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

- Tên đề tài:** *“Nghiên cứu áp dụng tin sinh học để quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng”*
- Mã số:** KC.04-34
- Thời gian thực hiện:** Từ 01/01/2005 đến 30/06/2007
- Cấp quản lý:** Nhà nước
- Kinh phí:** 2 300 triệu đồng (từ ngân sách Nhà nước)
- Thuộc chương trình:** Nghiên cứu khoa học và phát triển Công nghệ Sinh học (Mã số KC.04)
- Chủ nhiệm đề tài:** TS. Đặng Trọng Lương
- Cơ quan chủ trì:** Viện Di truyền Nông nghiệp -Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
- Mục tiêu của đề tài:**
 - ❖ Có được cơ sở dữ liệu (CSDL) về trạng thái sinh vật biến đổi gen (GMO) và sản phẩm của chúng;
 - ❖ Xây dựng và đề xuất được giải pháp quản lý về GMO và sản phẩm của chúng và biện pháp thực hiện, cảnh báo về tiềm ẩn rủi ro (nếu có);
 - ❖ Ứng dụng tin sinh học phục vụ công tác thu thập và xây dựng bản đồ chỉ thị phân tử các gen có liên quan đến tính trạng quan trọng của cây lúa.
- Các nội dung nghiên cứu chính của đề tài:**
 - Thu thập dữ liệu sinh vật biến đổi gen*
 - Thu thập các thông tin các cây trồng nông nghiệp, lâm nghiệp biến đổi gen, các dạng các mẫu thực phẩm, thức ăn gia súc, vi sinh vật từ tài liệu, trên mạng internet, các viện nghiên cứu, trường Đại học, CSDL AGBIOS, ISAAA;
 - Các dữ liệu liên quan đến cấu trúc gen được chuyển vào trong các sinh vật biến đổi gen;
 - Xây dựng cơ sở dữ liệu và thiết kế phần mềm*

- Thiết kế hệ thống cơ sở dữ liệu (khảo sát hiện trạng, thiết kế tổng thể, chi tiết)
- dựa trên môi trường Windows 2000 Server;
- Nghiên cứu, xây dựng phần mềm quản trị cơ sở dữ liệu tích hợp trong môi trường truyền thông, giao tiếp trên nền Web về các thông tin sinh vật biến đổi gen với chức năng: kết quả nghiên cứu, phân loại cập nhật, tra cứu, xuất bản, quản trị hệ thống, an toàn dữ liệu và các tiện ích khác;
- Phân tích, xử lý, biên tập, chuyển đổi, nhập thông tin dữ liệu;
- Thiết kế cài đặt phần mềm, kết nối dữ liệu, tích hợp các ứng dụng vào hệ thống thông tin trên mạng Internet nội bộ;
- Chạy thử, hiệu chỉnh và hoàn thiện;
- Xây dựng qui trình cập nhật thông tin, quản trị cơ sở dữ liệu và hướng dẫn khai thác sử dụng;

3. Phương pháp phát hiện GMO và sản phẩm của chúng

- Ứng dụng phần mềm PC-GENE để thiết lập các trình tự môi đặc trưng PCR, nhận biết promoter *p-35S*, *T-NOS*, gen *Bt*;
- Phân lập và tìm mẫu dò ADN lai với gen *Bt*, gen kháng kháng sinh;
- Phân tích, nhận biết một số dạng thức ăn gia súc từ cây trồng biến đổi gen hiện đang lưu hành trên thị trường trong nước;

4. Ứng dụng tin sinh học để lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa dự chiêm và gen chịu hạn ở lúa LC93-1

- Phát triển quần thể F_2 từ tổ hợp lai giữa giống CR203 và Dự Chiêm;
- Phát triển quần thể F_2 từ tổ hợp lai giữa giống LC93-1 và giống Khang Dân;
- Sử dụng các chỉ thị phân tử ADN để tìm đa hình bố mẹ của tính trạng kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dự chiêm;
- Sử dụng các chỉ thị phân tử ADN cho đa hình giữa bố mẹ của tính trạng chịu hạn ở lúa LC93-1;
- Đánh giá tính kháng nhiễm bệnh trên các giống bố mẹ và các con cháu F_2 của chúng;
- Đánh giá tính chịu hạn của các giống bố mẹ và các con cháu F_2 của chúng;
- Sử dụng dữ liệu kiểu hình (kháng/nhiễm) và kiểu gen (nhận dạng ADN) ở những cây F_2 để xác định vị trí nhiễm sắc thể của gen và chỉ thị liên kết chặt với gen. Phân tích và thiết lập bản đồ gen;

- Sử dụng phần mềm mapmarker, dữ liệu kiểu hình (chịu hạn/không chịu hạn) và kiểu gen (nhận dạng ADN) ở những cây F₂ để xác định vị trí nhiễm sắc thể của gen và chỉ thị liên kết với gen. Phân tích và thiết lập bản đồ gen.

Các sản phẩm của đề tài:

1. 01 cơ sở dữ liệu về sinh vật biến đổi gen;
2. 03 phương pháp nhận biết một số cây trồng chuyển gen và sản phẩm thức ăn gia súc;
3. 01 phần mềm cập nhật dữ liệu về sinh vật biến đổi gen;
4. 01 Website thông tin về sinh vật biến đổi gen;
5. 02 giải pháp quản lý một số sinh vật biến đổi gen có triển vọng;
6. 02 bản đồ chỉ thị phân tử của gen liên quan đến bệnh đạo ôn ở lúa Dực chiêm và gen chịu hạn ở lúa LC93-1;
7. Đào tạo 01 kỹ sư Công nghệ sinh học;
8. Có 03 bài báo đăng tại tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

11. Kinh phí thực hiện của đề tài (từ ngân sách nhà nước): 2 300 triệu đồng, trong đó:

- Thuê khoán chuyên môn: 838.200.000 đ
- Nguyên vật liệu năng lượng: 838.449.500 đ
- Thiết bị máy móc: 335.050.000 đ
- Chi khác: 288.300.500 đ

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. KHÁI NIỆM VỀ GMOs

Sinh vật biến đổi di truyền (GMOs-Genetically Modified Organisms) là cơ thể sống (ví dụ như cây trồng) mà vật chất di truyền của nó đã bị biến đổi nhờ phương tiện của kỹ thuật gen. Sự biến đổi di truyền thường bao gồm sự chèn đoạn ADN, tái tổ hợp những mảnh ADN nhỏ hay gen vào trong genome của cơ thể bị biến đổi. Quá trình này được gọi là chuyển nạp. Ở vi khuẩn và thực vật có đặc điểm tương tự thì sự biến đổi di truyền cũng có thể xảy ra nhờ sự thay đổi mã tồn tại mà không chèn ADN ngoại lai.

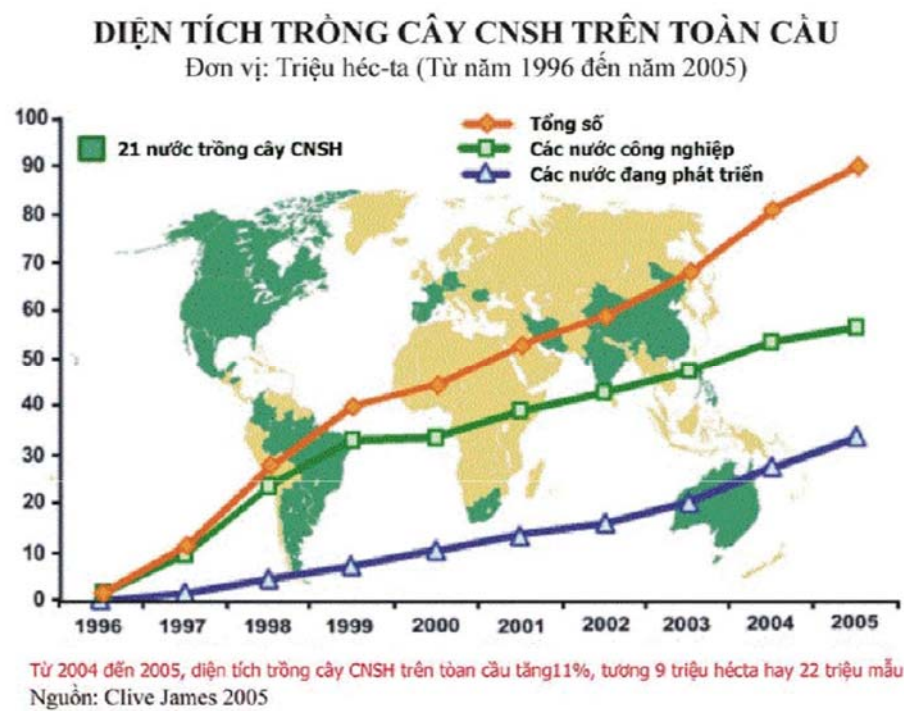
Cấu trúc của gen chèn điển hình trong GMOs được tạo nên bởi 3 bộ phận: (1) đoạn promoter (đoạn khởi động), có chức năng như một chiếc công tắc bật/mở để đọc gen đã biến đổi hoặc gen đã chèn. (2) gen đã được chèn (hoặc gen đã bị biến đổi) để mã hoá đặc điểm đã chọn lọc riêng biệt. (3) đoạn terminator (đoạn kết thúc), có chức năng như một tín hiệu dừng để đọc gen đã chèn (hoặc gen đã biến đổi). Ngoài ra, một vài thành tố khác có thể có mặt trong cấu trúc của gen chèn và chức năng của chúng thường là để điều chỉnh và ổn định chức năng của gen, hoặc để chứng minh sự có mặt của cấu trúc trong GMOs hoặc để có sự kết hợp dễ dàng của các thành phần khác nhau trong cấu trúc gen chèn. Cấu trúc gen phải được tương hợp với genome của cơ thể nhận để nó có sự di truyền ổn định. Vì thế genome của chính cơ thể nhận cũng là một thành tố quan trọng trong quá trình chuyển nạp [35].

1.2. TÌNH HÌNH THƯƠNG MẠI HOÁ SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN

1.2.1. Tình hình nghiên cứu và thương mại hoá cây trồng biến đổi gen

Với sự mới lạ của các cơ thể được cải tiến về mặt di truyền và sự liên quan đến an toàn sinh học đã buộc các chính phủ phải đề ra các qui định về cây chuyển gen. Vì thế nhiều cuộc thử nghiệm ứng dụng thành tựu của công nghệ gen đã và đang diễn ra trên toàn thế giới. Nhiều cây được chuyển gen để tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ (489 loài), tạo ra những tính trạng của gen đánh dấu (488 loài), khả năng chịu bệnh (185 loài), chống chịu côn trùng (89 loài), cải tiến chất lượng (72 loài)... [108].

Cây chuyển gen đầu tiên đó là cây thuốc lá kháng kanamycin (năm 1983). Năm 1994, cây cà chua chuyển gen đầu tiên đã được thương mại hoá [134]. Và đến năm 1996, sự phục hưng trong nông nghiệp đã xảy ra do sự thương mại hoá các cây trồng chuyển gen. Sự phát triển các cây chuyển gen là rất nhanh và để tư liệu hoá sự phát triển của ngành mới này, các thống kê sau đây đã được thu lượm từ các báo cáo thông tin từ trước tới nay. Năm 1996, GMC (Genetically Modified Crop) đã được trồng một cách phổ biến, diện tích tăng lên không ngừng: 2,8 triệu ha (1996), 12,8 triệu ha (1997), 27,8 triệu ha (1998), 40 triệu ha (1999), 44,2 triệu ha (2000), 52,6 triệu ha (2001), 58,7 triệu ha (2002) [22, 23, 72], 81 triệu héc-ta (năm 2004), và 90 triệu héc-ta (năm 2005).



Số quốc gia trồng cây chuyển gen đã tăng một cách đáng kể, từ 17 nước trong năm 2004 đã tăng lên 21 nước vào năm 2005, bao gồm 11 nước đang phát triển và 10 nước công nghiệp. Đáng chú ý là so với năm 2004, năm 2005 đã có 4 nước mới tham gia trồng cây chuyển gen, 3 trong số đó là các nước thuộc Liên minh Châu Âu, đó là Bồ Đào Nha, Pháp và Cộng hoà Séc, nước thứ 4 là Iran. Xếp theo thứ tự diện tích trồng từ lớn tới bé là Hoa Kỳ, Argentina, Brazil, Canada, Trung Quốc, Paraguay, Ấn Độ, Nam Phi, Uruguay, Ôxtralia,

Mêxicô, Rumani, Philippine, Tây Ban Nha, Colombia, Iran, Honduras, Bồ Đào Nha, Đức, Pháp và Cộng hoà Séc.

Bảng 1: Diện tích trồng cây chuyển gen tại một số quốc gia năm 2005

TT	Quốc gia trồng	Diện tích trồng (triệu héc-ta)	Loại cây trồng chuyển gen
1	Hoa Kỳ	49,8	Đậu tương, ngô, bông, cải canola, bí, đu đủ
2	Achentina	17,1	Đậu tương, ngô, bông
3	Braxin	9,4	Đậu tương
4	Canada	5,8	Cải canola, ngô, đậu tương
5	Trung Quốc	3,3	Bông
6	Paraguay	1,8	Đậu tương
7	Ấn Độ	1,3	Bông
8	Nam Phi	0,5	Ngô, đậu tương, bông
9	Uruguay	0,3	Đậu tương, ngô
10	Australia	0,3	Bông
11	Mêxicô	0,1	Bông, đậu tương
12	Rumani	0,1	Đậu tương
13	Philippin	0,1	Ngô
14	Tây Ban Nha	0,1	Ngô
15	Colombia	<0,1	Bông
16	Iran	<0,1	Lúa
17	Honduras	<0,1	Ngô
18	Bồ Đào Nha	<0,1	Ngô
19	Đức	<0,1	Ngô
20	Pháp	<0,1	Ngô
21	Cộng hòa Séc	<0,1	Ngô

Nguồn: Clive James, 2005

Hoa kỳ là quốc gia có diện tích cây trồng chuyển gen lớn nhất thế giới (chiếm 55% diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu), trong đó khoảng 20% là các sản phẩm gen xếp chồng (stacked gene) có chứa hai hoặc ba gen, với sản phẩm mang ba gen lần đầu tiên xuất hiện trong cây ngô ở Mỹ trong năm qua. Các sản phẩm mang từ hai gen trở lên hiện đã được triển khai ở Hoa kỳ, Canada, Ôxtraylia, Mêxicô, Nam Phi và đã được cho phép triển khai tại

Philippine, là xu hướng quan trọng và đang ngày một tăng trong tương lai, và thích hợp hơn khi xác định diện tích trồng theo đặc tính hơn là diện tích cây chuyển gen nói chung được đưa vào trồng. Số lượng diện tích trồng theo đặc tính ở Mỹ trong năm 2005 là 59,4 triệu héc-ta, tăng 19% so với diện tích trồng cây chuyển gen là 49,8 triệu héc-ta của năm 2004. Nếu xét trên toàn cầu thì diện tích trồng theo đặc tính này là 100,1 triệu héc-ta, tăng 10% so với con số 90 triệu héc-ta của năm 2004.

Trong vòng 10 năm qua từ năm 1996 tới năm 2005, tính trạng kháng thuốc diệt cỏ liên tục là tính trạng nổi bật, tiếp đến là tính trạng kháng sâu bệnh, và các gen xếp chồng mang cả hai đặc tính trên. Năm 2005, tính trạng kháng thuốc diệt cỏ đã được triển khai ở cây đậu tương, ngô, cải dầu và bông. Diện tích trồng các loại cây trồng mang tính trạng kháng thuốc diệt cỏ chiếm 71% tương đương với 63,7 triệu héc-ta trong tổng số 90 triệu héc-ta diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu, trong đó 16,2 triệu héc-ta (chiếm 18%) là trồng cây trồng *Bt* và 10,1 triệu héc-ta (11%) là diện tích gieo trồng các loại cây chuyển gen mang cả hai đặc tính chịu được thuốc diệt cỏ và kháng sâu bệnh. Các cây trồng mang cả hai đặc tính trên là nhóm tăng trưởng nhanh nhất trong năm vừa qua với mức tăng diện tích là 49% so với năm 2004, so với mức tăng 9% của cây trồng mang đặc tính kháng thuốc diệt cỏ và mức tăng 4% của cây trồng mang riêng đặc tính kháng sâu bệnh [27].

Năm 2004, Iran là nước đầu tiên thương mại hoá gạo chuyển gen có khả năng kháng sâu bệnh [28].

Trong tổng số 120 loại GMCs đã được trồng để làm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi thì đậu tương chuyển gen có diện tích gieo trồng lớn nhất với 54,4 triệu héc-ta (chiếm 60% diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu), tiếp đến là ngô (với diện tích trồng là 21,2 triệu héc-ta chiếm 24%), bông (với diện tích 9,8 triệu héc-ta, chiếm 11%) và cải dầu canola (với 4,6 triệu héc-ta, chiếm 5% diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu) [27].

Theo số liệu thống kê của Hội đồng Nông nghiệp (ROC) thì hàng năm Đài Loan nhập khoảng 600 tấn ngô, trong đó 96% là từ Mỹ. Và khoảng 30% ngô thương mại ở Đài Loan được đánh giá là ngô biến đổi gen [72].

Với thực tế thu được trong thập kỷ đầu tiên (từ năm 1996 tới năm 2005) cây trồng chuyển gen được đưa vào canh tác, có thể lạc quan cho rằng cây trồng chuyển gen sẽ tiếp tục tăng trưởng mạnh và có thể tăng cao hơn trong thập niên tiếp theo. Số lượng các nước đưa vào trồng 4 loại cây trồng chuyển gen chính dự kiến sẽ tiếp tục nhiều hơn, và diện tích trồng cùng với số lượng người trồng loại cây này cũng sẽ tiếp tục gia tăng do thể hệ cây trồng chuyển gen đầu tiên đang được sử dụng rộng rãi, và thế hệ thứ hai với cả các tính trạng đầu ra và đầu vào đang trở nên sẵn có. Ngoài các sản phẩm nông nghiệp truyền thống dùng làm lương thực, thực phẩm, làm thức ăn chăn nuôi, hay để lấy sợi, các sản phẩm nông nghiệp mới có thể dùng làm thuốc, làm thực phẩm chức năng, làm hóa chất, và đặc biệt là tạo ra các nguồn năng lượng có thể tái chế được, để thay thế cho các loại nhiên liệu hóa thạch, những loại nhiên liệu không thể tái chế được, gây ô nhiễm môi trường và các loại nhiên liệu khí đốt ngày càng trở nên đắt đỏ. Trong thời gian tới, tại các thị trường đã được thiết lập ở các nước công nghiệp, sự phát triển của các sản phẩm mang các tính trạng tổng hợp, được đo bằng diện tích cây trồng chuyển gen tính theo tính trạng, sẽ tiếp tục phát triển cùng với việc đưa ra giới thiệu các đặc tính tổng hợp đầu vào và đầu ra mới để tạo ra giá trị và đáp ứng được nhu cầu đa dạng của cả người sản xuất và người tiêu dùng, những người đang tìm kiếm các loại thực phẩm giàu chất dinh dưỡng và an toàn hơn, có giá rẻ hơn. Cây trồng chuyển gen với việc sử dụng các phương pháp canh tác tốt, sẽ tiếp tục giữ vai trò quan trọng như đã đạt được trong mười năm qua, và cần phải tiếp tục thực hiện vai trò then chốt, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, những quốc gia trồng cây trồng chuyển gen chủ yếu trong thập niên tới.

Ở Việt Nam cũng đã có nhiều công trình nghiên cứu chuyển gen tạo ra giống mới có các đặc tính ưu việt hơn so với giống thông thường. Một trong những thành tựu trong lĩnh vực chuyển gen này là tạo ra cây trồng có khả năng kháng bệnh và côn trùng. Ví dụ như: Nghiên cứu của các nhà khoa học thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp để chuyển gen *CryIAc* kháng sâu vào một số giống cải bắp (*Brassica oleracea* var *capitata*) nhờ *Agrobacterium*. Chủng *Agrobacterium* - GV 2260 mang vectơ nhị phân pART27 chứa gen chọn lọc *nptII* (*Neomycin Phosphat Transferase*)

kháng kanamycin và gen *CryIAC* mã hoá protein tinh thể kháng sâu.. Các gen này đã được biến nạp thành công vào một số giống cải bắp địa phương và lần đầu tiên kỹ thuật lai ADN Southern Blotting đã được sử dụng để phát hiện chính xác gen ngoại lai có trong cây bắp cải chuyển gen [25]. Gen *Bt* phối hợp giữa *CryIA(b)*-*CryIB* kháng cao với sâu đục thân cũng đã được chuyển nạp vào giống lúa Nàng Hương Chợ Đào nhờ vi khuẩn [26].

Một phương pháp khác đã được ứng dụng để chuyển gen kháng hygromycin, gen *GUS* và gen kháng bệnh bạc lá *Xa-21* vào lúa đó là phương pháp bắn gen. Sử dụng kiểu bắn gen Co-Bombardment là phương pháp đồng chuyển hai gen trên các plasmid khác nhau, ADN của các plasmid được bọc vào các hạt đạn theo protocol (Klein & CS, 1988). Lấy ADN của 2 plasmid *p35H* chứa gen marker (*hph*) và 1 plasmid chứa gen quan tâm (gen *GUS* hoặc *Xa-21*) trộn với tỷ lệ 1:8, nhỏ vào 100 µl gold suspension. Với sự có mặt của CaCl_2 và spermidin, ADN sẽ được bọc chắc vào đạn. Những hạt đạn này sẽ được dùng để bắn thẳng vào mô lúa. Kết quả là các gen mong muốn đã được chuyển vào 2 giống lúa *Japonica Tp309* và *Indica VL901* (kết quả này được khẳng định nhờ phản ứng PCR và phản ứng hoá mô với hoạt tính của *GUS*) [25]. Cũng với phương pháp này các nhà khoa học thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới TP.HCM và Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (IRRI) đã sử dụng thiết bị bắn gen trên tế bào huyền phù giống lúa Việt Nam Tài Nguyên và đã thu nhận được một số dòng cây chuyển gen mang gen *CryIA(b)*-*CryIA(c)* kháng sâu đục thân [26].

Phương pháp chuyển gen trực tiếp vào tế bào trần cũng đã được thực hiện thành công ở cây súp lơ (*B. Olebacea L.Var.Botrytis*). Kỹ thuật chuyển gen vào tế bào trần với việc sử dụng ADN plasmid mang các gen quan tâm đã được cải tiến bởi nhiều tác giả. Với việc sử dụng PEG (*Polyethylen Glycol*) như một yếu tố hấp thụ ADN, các nhà khoa học thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam và Đức đã chuyển gen trực tiếp vào tế bào trần của cây súp lơ; đó là các gen *TuMV-cP* mã hoá cho protein vỏ của virus khảm củ cải, gen *hpt* mã hoá cho enzym *hygromycin phosphotransferase*, gen *gfp* mã hoá cho protein phát huỳnh quang màu lục. Kết quả là với sự hỗ trợ của PEG, cả 3 gen trên đều được chuyển đồng thời vào protoplast [24].

Một hướng khác của các nhà khoa học Việt Nam là tạo ra cây trồng có khả năng kháng thuốc trừ cỏ. Thành tựu này đã được ứng dụng thành công ở cây thuốc lá. Các

nhà khoa học thuộc Viện sinh học nhiệt đới (Trung tâm KHTN & CN Quốc gia) và trường ĐH Nông lâm TP.HCM đã sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa plasmid ITB mang gen *bar* (gen kháng thuốc trừ cỏ basta), gen *CryIA(c)*, gen *GUS* để chuyển nạp vào trong cây thuốc lá. Qua kết quả phân tích PCR, bước đầu đã khẳng định gen *bar* (và cả 2 gen trên) đã được chuyển vào nhiễm sắc thể của cây. Và qua nghiên cứu cho thấy đã có sự di truyền và sự phân ly theo quy luật Mendel (với tỷ lệ 3:1) của gen *bar* ở thế hệ T₁ của cây thuốc lá chuyển gen và gen này ở dạng trội [26].

Gen *bar* (mã hoá cho enzym *Phosphinothricin Acetyl Transferase*) cũng đã được biến nạp vào cây cải dầu nhờ chủng *Agrobacterium AGL1* (có chứa plasmid *pDM805* mang gen *GUS* và gen *bar*). Và kết quả bước đầu đã thu nhận được 20 cây cải dầu mang gen *GUS* và gen *bar* tại Viện Di truyền Nông nghiệp [3].

Việt Nam cũng đã tạo ra được giống lúa tổng hợp được Vitamin A (golden rice) và kháng sâu nhờ ứng dụng kỹ thuật di truyền (Trần T. Cúc Hoà & CS, 2003, 2005). Tuy đã có một số công trình nghiên cứu chuyển gen ở thực vật, nhưng tất cả chúng vẫn chỉ được thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm và chưa được thử nghiệm trong sản xuất. Trong tương lai không xa, hy vọng rằng các cây trồng chuyển gen của Việt Nam sẽ được công nhận và được đưa vào thương mại hoá, sản xuất rộng rãi.

Như vậy là trong một khoảng thời gian rất ngắn GMCss đã phát triển với tốc độ rất nhanh, nó đã và đang trở thành sản phẩm hàng hoá được thương mại hoá khắp toàn cầu. Người ta ước tính rằng sản phẩm GMC của Mỹ có mặt trong hơn 2 vạn các loại mặt hàng thực phẩm. Thị trường toàn cầu về cây trồng biến đổi gen và sản phẩm dẫn xuất của nó bắt đầu tăng trưởng nhanh chóng từ năm 1995. Doanh thu về lĩnh vực này cũng ngày một tăng: năm 1995 là 75 triệu USD, năm 1996 là 235 triệu USD, năm 1997 là 670 triệu USD, năm 1998 là 1,6 tỷ USD, năm 1999 khoảng 2,1 – 2,3 tỷ USD. Trong vòng 5 năm mà doanh thu tăng lên đến gần 30 lần. Năm 2004 là 6,5 tỉ đô-la, và nếu tính gộp tất cả lợi ích kinh tế từ năm 1996 cho tới năm 2004 thì số tiền này là 27 tỉ đô-la (trong đó các nước đang phát triển thu được 15 tỷ và các nước công nghiệp thu được 12 tỉ). Dự toán kim ngạch về lĩnh vực này vào năm 2010 là khoảng 25 tỷ USD [27]. Trong những thập kỷ tới năng suất cây trồng sẽ tăng 10 – 25% nhờ các cây chuyển gen, điều đó sẽ đảm bảo cho việc xoá đói ở các nước nghèo cũng như đảm bảo về lương thực thực phẩm cho toàn cầu.

1.2.2. Thực trạng nghiên cứu động vật biến đổi gen

Khi biết rằng gen quyết định tính trạng của sinh vật là một đoạn ADN. Vì vậy nếu lấy gen bên ngoài rồi dùng phương pháp nhân tạo chuyển dịch nó vào trứng đã thụ tinh của một loài động vật nào đó thì gen này nhờ sự phân chia của trứng đã thụ tinh và sự phát dục của phôi mà phân bố khắp cả tế bào [14]. Hay bằng kỹ thuật vi tiêm, người ta đưa gen lạ, gen mới vào nhân của tinh trùng trong hợp tử. Nuôi cấy hợp tử trong ống nghiệm cho đến giai đoạn phôi dâu hoặc phôi bào, rồi cấy chuyển vào tử cung con vật nhận, được gây chữa giả. Loài động vật có mang gen ngoại lai này được gọi là động vật chuyển gen .

Với kỹ thuật tiên tiến của công nghệ sinh học hiện đại trên đối tượng vật nuôi, cụ thể là công nghệ gen vật nuôi, người ta đã tạo được các vật nuôi, gia súc có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao, nâng cao phẩm chất, chất lượng, tăng sản lượng sữa...; tạo ra các giống gia súc, vật nuôi có khả năng kháng bệnh cao. Nhiều thí nghiệm về động vật chuyển gen đã được tiến hành, một số động vật được chuyển gen để dùng chữa bệnh (trong y học), một số khác được dùng trong mục đích chăn nuôi như bò, lợn, cừu, dê, thỏ, gà, cá... Năm 1985, một số nhà khoa học Trung Quốc đã chuyển gen kích thích sinh trưởng của người vào trứng thụ tinh của cá vàng và cá chạch. Kết quả là có 10% cá chạch có tốc độ lớn nhanh, gấp 3 – 4 lần so với cá chạch thường [42]. Trong vòng 10 năm qua, bằng kỹ thuật vi tiêm để đưa gen lạ vào tế bào trứng, hàng loạt cá chuyển gen đã được tạo ra như cá hồi cầu vòng, cá chép, cá trạch, cá trê... Và đã có trên 10 loài bao gồm bò, heo, dê, cừu, thỏ, gà, cá... đã được nghiên cứu chuyển gen theo hướng tạo ra được những giống gia súc và vật nuôi có sức đề kháng bệnh tật, có khả năng cải thiện đáng kể về chất lượng của thịt, sữa và trứng. Người ta hy vọng trong thời gian không xa sẽ tạo được loại thịt lợn có tỷ lệ nạc rất cao, giống như thịt bò, sữa bò có tỷ lệ đậm cao, trứng gà có lòng đỏ to, màu đỏ đậm hơn, tỷ lệ lecithine cao và vỏ cứng [5].

Với kỹ thuật cấy ghép gen, cấy ghép hợp tử, nuôi cấy tế bào, việc chọn lọc nhân giống gia súc đã đạt được bước tiến có ý nghĩa rất quan trọng. Từ một

con bò giống tốt được chọn lọc cho thụ tinh nhân tạo với một giống tốt khác sẽ tạo được hợp tử lai mang đặc tính chọn lọc cần thiết, có thể dễ dàng lấy được hợp tử này ra và vận chuyển từ nước này sang nước khác để cấy vào tử cung của các con bò địa phương bất chúng mang thai để đẻ ra những bê con có những đặc tính ưu việt được chọn lọc. Người ta cũng đã thành công khi lấy bỏ nhân từ trứng đã thụ tinh của một con bò bình thường rồi cấy thay thế vào đó nhân tế bào của con bò có những đặc tính tốt được chọn lọc, tạo ra được trứng thụ tinh có nhân mới. Sau đó đưa trứng này trở lại vào tử cung của con bò bình thường để cho nó mang thai và đẻ ra bê con có được những đặc tính như các chuyên gia tạo giống mong muốn [5].

Ở Việt nam cũng đã có công trình nghiên cứu về tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng người ở 2 loại cá vàng và cá chạch nhờ vi tiêm. Kết quả thu được cho thấy: các phôi trần được tạo bằng sử dụng enzym trypsin cho tỷ lệ nở cao (80%), tỷ lệ cá con sống sau 3 ngày tuổi đạt tới 94%, trứng cá vi tiêm hormone sinh trưởng đạt tỷ lệ nở từ 12 - 16% và trọng lượng cá sau 45 ngày tuổi lớn gấp 1,5 – 2,5 lần so với cá không chuyển gen [1]. Việc chuyển gen sừng keratin vào động vật như dê, thỏ ...cũng đã làm cho phẩm chất lông của chúng được cải thiện [14].

Hiện nay có triển vọng nhiều hơn cả là công trình vi tiêm gen Mx vào lợn, tạo được giống lợn miễn dịch với bệnh cúm. Người ta cũng đã thành công khi vi tiêm gen IgA vào lợn, cừu tạo ra các giống vật nuôi miễn dịch được với nhiều bệnh. Hay đã thành công khi vi tiêm insulin bò vào lợn, cừu, dê, gà tạo được giống gia súc cho thịt không dính mỡ. Một hướng mới, đầy triển vọng là vi tiêm một số gen của vi sinh vật vào cơ thể vật nuôi như đưa gen mã hoá enzym xúc tác tổng hợp acid amin Xystein để tạo giống cừu mới cho năng suất lông cao gấp nhiều lần. Hiện nay đưa gen tổng hợp treonin và lyzin có nguồn gốc vi sinh vật vào để làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn của vật nuôi [18].

1.2.3. Thực trạng nghiên cứu vi sinh vật biến đổi gen

Kỹ thuật di truyền đã mở ra những triển vọng, viễn cảnh mới về lý thuyết thì không có giới hạn: con người có thể thiết kế và tạo ra những vi sinh vật, những tế bào mà trước đây chưa hề có. Những vi sinh vật nhân tạo này có thể tổng hợp ra ở quy

mô công nghiệp những sản phẩm có giá trị phục vụ đặc lực cho việc bảo vệ sức khỏe và nâng cao chất lượng sống của con người.

Sản phẩm thành công đầu tiên của con người khi sử dụng kỹ thuật di truyền tác động vào vi sinh vật để sản xuất sản phẩm sinh học thông qua chuyển gen vào vi khuẩn *E.coli* là Insulin và Hormon sinh trưởng (1982 và 1987). Năm 1998 có khoảng dưới 1% dược phẩm có chứa protein được tổng hợp tái tổ hợp đạt giá trị tới 12 tỷ USD. Vi sinh vật được coi như là một nhà máy sinh học, chúng được sử dụng có hiệu quả trong nghiên cứu tái tổ hợp ADN, thiết kế gen, nhân dòng và biểu hiện protein cần quan tâm.... Bên cạnh những ưu điểm của vi sinh vật cho nghiên cứu cơ bản, nó còn đóng vai trò hết sức quan trọng trong ngành công nghiệp thực phẩm, sản xuất nước giải khát, sản xuất bia, chế biến bánh kẹo, thực phẩm chế biến... Trong lĩnh vực chế biến thực phẩm, vai trò của vi sinh vật chuyển gen góp phần đáng kể và chính nó đã tạo nên bước chuyển dịch công nghệ trong một số ngành chủ lực như: Enzyme *Amylase* bền nhiệt được tổng hợp nên bởi chủng vi khuẩn *Bacillus Licheniformis* mang gen mã hoá enzyme có nguồn gốc từ *Bacillus Stearothermophylus* được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất rượu, bia, nước giải khát để thuỷ phân tinh bột. Ngoài ra, người ta cũng đã chuyển gen mã hoá Enzyme *Acetolactate Decarboxylase* từ vi khuẩn *Bacillus Brevis* vào *B.subtilis* để sử dụng cho sản xuất bia, nhằm giảm thời gian lên men phụ và quá trình tổng hợp diacetyl...

Điều quan tâm nữa về vai trò hữu ích của vi sinh vật hiện nay là làm sạch sự ô nhiễm của môi trường, ví dụ điển hình là chế phẩm EM. Ngoài ra vi sinh vật đóng vai đặc biệt hữu ích khác như sản xuất phân bón vi sinh, phân giải nguồn nước ô nhiễm, phân giải nguồn nước nhiễm dầu... Vi sinh vật là đối tượng dễ biến đổi gen do tính chất đặc thù của chúng về cấu tạo phân tử, chu kỳ vòng đời ngắn, khả năng thích ứng rộng... Do vậy, việc lưu trữ nguồn sinh vật biến đổi gen là cần thiết không chỉ phục vụ cho nghiên cứu, khai thác sử dụng mà còn quản lý tiềm ẩn rủi ro do vi sinh vật biến đổi gen gây ra.

Ở Việt Nam, việc tạo ra các vi sinh vật chuyển gen nói chung và các loại cây trồng chuyển gen trong nông nghiệp nói riêng đã và đang mang lại nhiều lợi ích cơ bản và lâu dài trong nhiều lĩnh vực khác nhau: Nông nghiệp, công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp dược, công nghiệp y tế, môi trường,

kinh tế, thương mại... của thế giới như ông Michael Kenward, tác giả của bài báo với tiêu đề “Công nghệ sinh học hướng tới thời đại lớn” (Biotech heads for the Big time) đã đánh giá rằng, nếu thế kỷ XX được đánh dấu bằng cuộc cách mạng điện tử, thì thế kỷ XXI được đặc trưng bởi cuộc cách mạng công nghệ sinh học [21]. Với tầm nhìn xa hơn nữa, Việt Nam chúng ta phải có sự lựa chọn giữa cơ hội phát triển nền kinh tế trong xu thế hội nhập và toàn cầu hoá để có những quyết sách đúng đắn, nhằm đầu tư, phát triển và thừa hưởng những thành quả của công nghệ sinh học nói chung và của vi sinh vật chuyển gen nói riêng, do chính bàn tay và trí tuệ của người Việt Nam chúng ta tạo ra.

1.3. VẤN ĐỀ AN TOÀN VÀ RỦI RO CỦA SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN

Một vấn đề tranh cãi lớn về những rủi ro về môi trường như là sự phát triển tính kháng, những tác động xấu lên những côn trùng có lợi và sự lai phấn chéo với các loài hoang dã của các cây trồng canh tác. Cũng tồn tại một mối lo ngại về cây trồng kháng thuốc trừ cỏ lại trở thành cỏ dại khó diệt đối với các cây trồng khác. Những bằng chứng hiện có về lĩnh vực này vẫn tiếp tục được đảm bảo một cách chắc chắn và trọn vẹn và chỉ đạo một cách cẩn thận và chặt chẽ trước khi các cây trồng chuyển gen được triển khai trên diện rộng. Tuy nhiên, gắn liền với phân tích lợi hại trong từng trường hợp, chúng ta tin rằng có cơ sở dữ liệu tin cậy để mà hỗ trợ sự triển khai trên diện rộng.

Tuy nhiên, có một vài vấn đề đáng lo ngại trong công chúng về vấn đề an toàn sinh học và tác động môi trường của các cây trồng chuyển gen. Cũng có sự đòi hỏi áp dụng chặt chẽ những điều luật về an toàn sinh học khi mà đề cập đến vấn đề phát triển và triển khai cây trồng chuyển gen. Nhu cầu và quy mô về sự chứng thực an toàn có thể được dựa trên sự so sánh các lương thực mới và nguồn lương thực tương tự. Trong mối tương quan với môi trường cần phải nhìn nhận và đánh giá mối tương tác giữa các đối tượng chuyển gen với môi trường. Những điều luật về an toàn sinh học cần tập trung vào sự an toàn, chất lượng, và hiệu quả. Những điều luật về an toàn sinh học đòi hỏi có những thông tin về các mặt sau đây: (i) Sự tổ chức và con người liên quan; (ii) Những loài cho và nhận ADN; (iii) những điều kiện về sự phóng thích và môi trường đích; (iv) sự tương tác giữa các cây trồng chuyển gen và môi trường và; (v) điều khiển quá trình xử lý chất thải và kiểm soát chúng.

Sự quản lý, giải thích và sử dụng thông tin sẽ là một thành tố quan trọng về đánh giá các rủi ro và xác định hiệu quả và mức sự tin cậy của công nghệ. Trong khi quan tâm đến vấn đề triển khai của các cây trồng chuyển gen, ta cần phải quan tâm đến : (i) – sự phóng thích của các cây trồng chuyển gen không làm xuất hiện các loại sâu bọ mới, (ii) nếu kỹ thuật chuyển gen chứa đựng những rủi ro lớn hơn sự chọn lọc truyền thống, ví dụ như trường hợp chuyển gen vào các loài họ hàng hoang dã sẽ dẫn đến sự mở rộng kết cấu các loài và kết quả là tăng sự kìm hãm về đa dạng trong các khu vực lân cận và (iii) việc đưa vào môi trường các cây trồng chuyển gen sẽ làm tăng diện tích đất nông nghiệp ở những nơi mà nông nghiệp không thể được đưa vào thực tiễn sớm hơn, ví như đem lại những hệ sinh thái tự nhiên có giá trị trong nông nghiệp.

Rủi ro lớn nhất của các cây trồng chuyển gen đang được phóng thích vào môi trường là tiềm năng lan rộng của nó trên những địa bàn được trồng cấy sẽ trở thành cỏ dại. Mặc dù đã có những thảo luận nhỏ về các cây trồng đang trở thành cỏ dại như là hệ quả của chọn giống cây trồng, có thể có một số ngoại lệ ví dụ như cải dầu ở Châu Âu. Điều này cũng có thể không phải do sự cạnh tranh của các cây trồng cạnh tranh mới mà đã được chọn giống cho năng suất cao trong điều kiện cơ sở tốt. Tuy nhiên cải dầu lại mang những đặc tính liên quan đến cỏ dại mà nhiều hạt nhỏ được phát tán và có ưu thế cạnh tranh rất cao.

Một trong những nguy hiểm của cây trồng chuyển gen là sự truyền các gen vào các họ hàng hoang dại dưới áp lực của chọn lọc tự nhiên (kiểm soát sinh học). Những sâu bọ đích không đóng bất kỳ vai trò nào trong điều hoà quần thể vật chủ hoang dã, chuyển gen không chắc chắn tạo ra bất kỳ mối nguy hiểm nào. Hơn thế nữa sự tăng tính kháng trong các họ hàng hoang dại cũng có thể hoạt động như một thành phần của sự kiểm soát sâu hại nếu những hoạt động này là của vật chủ thay thế đối với sâu bọ hại đích.

Những lo ngại về vấn đề an toàn của lương thực chuyển gen cũng đã tăng lên. Hầu hết các độc tố *Bt* đặc hiệu đối với sâu hại khi chúng được kích hoạt trong môi trường kiềm trong đường ruột của sâu bọ. Những protein *Bt* bị phân huỷ nhanh chóng nhờ dịch dạ dày của động vật có xương sống. Không có những sự thay đổi chủ yếu nào được quan sát thấy trong thành phần của cà chua và khoai tây chuyển gen. Cà chua chuyển gen *Bt* không hàm chứa những rủi ro phụ đối với sức khỏe con người và động vật. Tuy nhiên, số lượng các khía cạnh can hệ đến đánh giá tính an toàn của cà

chưa chuyển gen *Bt* đòi hỏi những nghiên cứu sâu rộng hơn. Không có những khác nhau trong sức sống và trọng lượng cơ thể của gà được nuôi nhốt hay là những chế độ ăn được định sẵn với ngô chuyển gen *Bt* khi so sánh với những con đối chứng. Hàm lượng Gossypol, axit béo vòng cyclopropanoid, và aflatoxin trong các hạt của các cây chuyển gen tương tự hoặc thấp hơn trong các cây bố mẹ và các giống thương phẩm. Hạt của các dòng bông chuyển gen *Bt* cũng tương ứng về thành phần dinh dưỡng với các hạt của các cây bố mẹ và giống bông thương phẩm. Protein CryIA(b) là một thành phần của các cây ngô chuyển gen sau thu hoạch mất dần trên bề mặt hoặc được trồng cấy trong đất hoặc trong gia súc ủ xilô được chuẩn bị từ các cây trồng chuyển gen vẫn chưa được xác định.

Một vài hợp chất được tạo ra bởi cây trồng hoạt động như là cơ chế phòng thủ tự nhiên chống lại các động vật ăn cỏ. Những hợp chất này bao gồm các cơ chất bậc hai (như là terpenoids, flavonoids, alkaloid, vv...), α -amylase và chất ức chế trypsin, lectin và những protein có liên quan đến phản ứng bệnh. Một vài trong số này có tiềm năng sử dụng để triển khai các cây trồng chuyển gen để cung cấp những tính kháng đối với sâu bệnh hại. Tuy nhiên, một số hợp chất thứ cấp của cây trồng có thể độc với động vật có vú trong đó có con người. Điều này có thể dẫn đến sự từ bỏ giữa các loại thuốc trừ sâu được tạo ra bởi các cây trồng chuyển gen hay những giống được tạo ra bởi các chương trình chọn giống truyền thống, với thuốc trừ sâu tổng hợp. Hơn thế nữa, có thể đưa được những protein mới vào những cây trồng lương thực không chỉ từ cây trồng mà còn từ vi khuẩn, vi rút, nấm; sự gây dị ứng của chúng vẫn chưa được biết ví như các gen cho methionine mang nhiều protein từ các quả hạch Brazil đã được đưa vào đậu tương với mục đích tăng hàm lượng protein của đậu tương. Tuy nhiên, đậu tương chuyển gen mang gen này đã phát hiện có những protein gây dị ứng đã biết, và vì vậy việc phát triển chúng có thể bị ngưng lại. Nếu nguồn protein dị ứng đã biết có liên quan đến những gen được đưa vào từ những nguồn chưa được con người sử dụng làm thức ăn thì sau đó những gen này không nên được sử dụng trong biến nạp di truyền vào cây trồng lương thực.

Sự thương mại hoá ô ạt các cây trồng biến đổi gen đã và đang diễn ra ở Mỹ và một số nước khác đều do các công ty Công nghệ Sinh học xuyên quốc gia (chủ yếu thuộc các tập đoàn tư bản Mỹ) khống chế. Sự bành trướng thái quá này đã làm dấy lên làn sóng bài Mỹ ở các nước khác, nhất là ở Châu Âu. Ngoài ra, sự phản đối sinh vật biến đổi gen còn bắt nguồn từ một yếu tố cơ bản khác. Đó là mối lo ngại về các

ảnh hưởng bất lợi có thể có ở các sinh vật biến đổi gen đối với sức khỏe con người và môi trường sinh thái.

Vì vậy yêu cầu đặt ra khi thương mại hoá GMC và sản phẩm của nó là: chúng ta cần phải xét vấn đề về mức độ an toàn của các sản phẩm này lên hàng đầu. Nỗi lo sợ về độ an toàn của thực phẩm đang ngày một lớn, đặc biệt là khi Anh và các nước Châu Âu khác phát hiện ra hoá chất rửa phim điện não đồ dạng xốp ở trâu bò và chất ô nhiễm Dioxin ở các sản phẩm gia cầm tại Bỉ, đã làm cho người tiêu dùng giảm lòng tin đối với ngành công nghệ thực phẩm [77, 101].

Vậy liệu những nghiên cứu để đánh giá GMOs về độ an toàn trong thời gian sử dụng có chính xác hay không? Đặc biệt là mối quan tâm về đặc tính gây dị ứng và khả năng tác động đến sự kháng kháng sinh của GMOs [79].

Để cải thiện tình trạng này thì các nhà sản xuất phải xem xét một cách nghiêm túc về tính an toàn của sản phẩm. Vì thế bất kỳ một sản phẩm chuyển gen nào trước khi được 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 mặt dinh dưỡng, độc tính, khả năng gây dị ứng và các khía cạnh khoa học thực phẩm khác. Những đánh giá về an toàn thực phẩm này dựa trên những quy định của từng nước. Chúng bao gồm: một hướng dẫn sử dụng sản phẩm, một thông tin chi tiết về mục đích sử dụng sản phẩm, các thông tin về phân tử, hoá sinh, độc tính, dinh dưỡng, và khả năng gây dị ứng.... “ Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với 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”(Tổ chức lương thực thực phẩm Úc-New Zealand, 2000).

1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH GMOs

Vấn đề an toàn thực phẩm luôn được người tiêu dùng quan tâm hàng đầu, với bất kỳ sản phẩm thực phẩm nào họ cũng luôn thắc mắc rằng liệu sản phẩm đó có an toàn hay không ? Người tiêu dùng luôn muốn được biết rõ đầy đủ thông tin về sản phẩm mà họ đang tiêu thụ và với cả sản phẩm GMOs cũng không nằm ngoài yêu cầu đó. Vì vậy việc nhận biết GMOs là rất cần thiết đối với nhiều ứng dụng như để đánh giá mức độ sạch của hạt giống hay đối với việc bắt buộc dán nhãn thực phẩm ở một

số quốc gia. Nhiều kỹ thuật đã được tiến hành thử nghiệm và mỗi kỹ thuật có những ưu nhược điểm khác nhau nhưng chúng đã đáp ứng được các nhu cầu cần thiết như: dán nhãn thực phẩm và đánh giá mức độ sạch của hạt giống,...

Có nhiều quy trình để kiểm tra GMOs, kể cả các thử nghiệm sinh học dựa trên kiểu hình, cũng như dựa trên cơ sở ADN và protein.

1.4.1. Phương pháp xác định dựa trên cơ sở ADN

Phương pháp xác định dựa trên cơ sở ADN dựa theo nguyên tắc bổ sung của hai mạch ADN xoắn kép mà ở đó chúng lai theo một phương thức đặc hiệu về trình tự. ADN của GMOs có chứa một vài thành tố mà nó làm ảnh hưởng đến hoạt động của ADN. Các thành tố này là trình tự promoter, gen cấu trúc và trình tự 'stop' đối với gen. Mặc dù có một vài kỹ thuật khác nhưng chỉ có kỹ thuật Southern blot và PCR là được sử dụng phổ biến [29, 116]. Hiện nay, kỹ thuật Microarray cũng đã được phát triển [63].

1.4.1.1. Kỹ thuật PCR định tính

PCR khai thác tính đặc hiệu ADN polymerase để khuếch đại chọn lọc các đoạn ADN đặc hiệu ở tần số thấp trong hỗn hợp phức hợp các trình tự ADN khác [29]. Trong xét nghiệm PCR tiêu chuẩn, hai cặp mồi đã được sử dụng. Các cặp mồi này được thiết kế để bắt cặp trên các chuỗi đối ngược của trình tự đích, và khuếch đại trình tự giữa các mồi thành hàng triệu lần qua một loạt chu kỳ lặp lại. Việc phân tách ADN đã khuếch đại theo kích thước có thể phụ thuộc vào điện di gel agarose, mặc dù các kỹ thuật phân tách khác chẳng hạn như sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và điện di mao quản (CE) cũng đã được ứng dụng [29, 47].

Hiện nay, người ta thấy hầu hết GMOs đều có chứa 1 trong 3 yếu tố di truyền sau: promoter *CaMV 35S* của vi rút khảm súp lơ, terminator NOS và gen chỉ thị kháng kháng sinh (*nptII*). Các yếu tố này cũng xuất hiện 1 cách tự nhiên trong cây trồng và vi sinh vật đất, và vì vậy chúng có thể được phát hiện nhờ kỹ thuật PCR với các kết quả dương tính sai. Nếu phân tích PCR cho kết quả dương tính thì các kỹ thuật PCR đặc hiệu sản phẩm đối với loại thực phẩm GM khác nhau có thể được tiến hành. Các kỹ thuật này khai thác bộ mồi mà nó nối đường ranh giới của hai yếu tố di truyền gần kề nhau (ví dụ như các đoạn promoter, các gen đích, các đoạn terminator), hoặc các cặp mồi này đặc hiệu đối với việc phát hiện trình tự gen đích đã biến đổi. Giới hạn nhận biết nằm trong vùng từ 10 – 20 ng ADN đích và 0,0001% - 1% GMOs [146].

Các phương pháp khác có thể được sử dụng để nhận biết các kết quả PCR. Phương pháp đầu tiên là sự phân tách đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại nhờ cắt enzym giới hạn [86]. Phương pháp thứ hai là lai với mẫu dò đặc hiệu đối với trình tự đích [66]. Phương pháp thứ ba là giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR [116]. Phương pháp thứ tư là PCR xếp lồng vào nhau (nested PCR), mà trong đó hai bộ mồi liêt kết một cách đặc hiệu với trình tự đích đã khuếch đại.

Gần đây, hãng GeneScan Europe đã đưa ra bộ kit kiểm tra để nhận biết GMOs trong các sản phẩm thực phẩm, sử dụng multiplex PCR để nhận biết đặc hiệu đối với trình tự ADN từ cây trồng và các tính trạng GM [54]. Đầu tiên là phải tách chiết và tinh sạch ADN. Sau đó là khuếch đại trình tự ADN đặc hiệu từ cả cây trồng và các tính trạng GM nhờ 2 phản ứng multiplex PCR riêng biệt, các sản phẩm của cả 2 phản ứng được trộn với nhau, và chuỗi ADN kép được tách thành mạch đơn nhờ cắt bởi enzym exonuclease. Sau khi trộn với đệm lai, mẫu được trải vào khoanh mỏng. Các trình tự đã khuếch đại sẽ lai với các mẫu dò cADN bao quanh khoanh mỏng, sau đó được nhuộm với thuốc nhuộm huỳnh quang Cy5 và được phân tích nhờ đầu đọc Biochip (ví dụ Biodetect 654TM). Giới hạn nhận biết đối với Kit Chip GMO nằm trong vùng 250 bản sao của mỗi trình tự ADN đích trong PCR.

1.4.1.2. PCR điểm cuối định lượng (Quantitative End-point PCR)

Vấn đề chính của phân tích GMOs trong thực phẩm là định lượng, bởi vì giới hạn tối thiểu của GMOs trong thực phẩm là cơ sở để dán nhãn hàng hoá ở nhiều quốc gia, điển hình là Liên minh Châu Âu [34, 67], Nhật Bản, Hàn Quốc và Đài Loan [42]. Vì vậy, các phương pháp PCR định lượng rất cần thiết. PCR được gọi là định lượng nếu ADN chuẩn nội sinh được đồng khuếch đại với ADN đích [93]. Trong các hệ thống như phương pháp PCR cạnh tranh định lượng (QC-PCR), sự xuất hiện của các chất ức chế PCR sẽ được thông báo ngay lập tức vì sự khuếch đại của cả ADN chuẩn và ADN đích sẽ bị ảnh hưởng đồng thời [123].

QC-PCR gồm 4 bước: (1) Đồng khuếch đại ADN chuẩn và ADN đích trong ống phản ứng PCR; (2) Phân tách các sản phẩm nhờ phương pháp thích hợp, chẳng hạn như điện di gel agarose và nhuộm gel bằng ethidium bromide; (3) Phân tích độ dày của gel; (4) Ước lượng một cách tương đối số lượng ADN tiêu chuẩn và ADN đích nhờ phân tích hồi quy. Ở điểm cân bằng, nồng độ khởi động của ADN đích và ADN

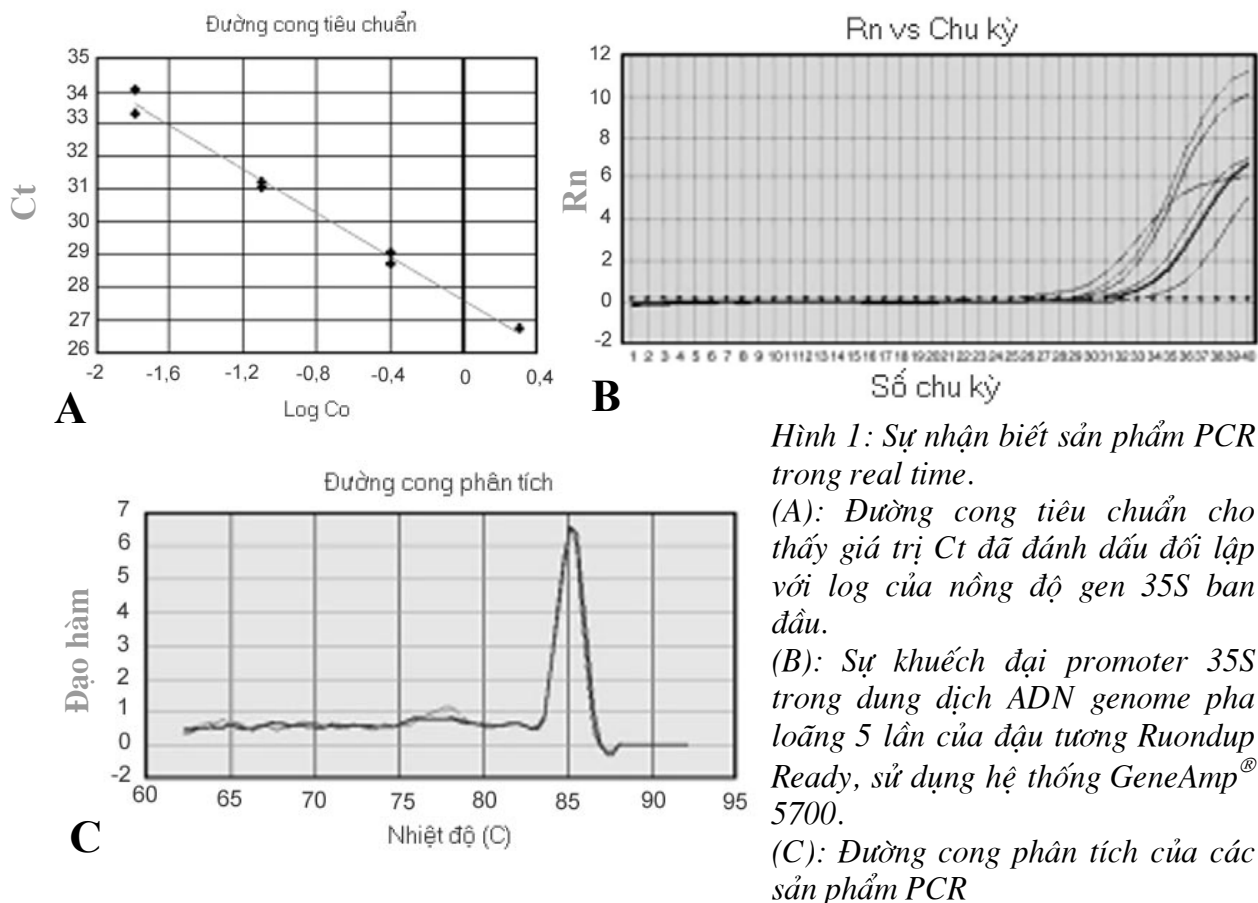
chuẩn nội sinh là tương đương nhau. Trong QC-PCR, sự cạnh tranh giữa việc khuếch đại ADN chuẩn nội sinh và ADN đích dẫn tới làm mất độ nhạy của sự nhận biết.

PCR-ELISA sử dụng chiến lược của nhóm thứ 2 và có thể được định lượng khi PCR đã bị dừng trước khi có sự giảm tín hiệu trong hiệu suất khuếch đại tìm thấy. ELISA đã được sử dụng để định lượng một cách tương đối số lượng thấp các sản phẩm PCR [53, 81]. Mặc dù thực tế, việc định lượng tương đối sử dụng PCR-ELISA đã được ứng dụng ở các lĩnh vực khác nhau [127] và bộ kit nhận biết GMOs sử dụng PCR-ELISA đã được thương mại hoá (D-Genos, Angers, Pháp), kỹ thuật này không được ứng dụng rộng rãi đối với mục đích định lượng GMOs chính xác.

1.4.1.3. PCR định lượng xử lý số liệu thông qua máy tính (Quantitative Real-time PCR)

Để khắc phục một số nhược điểm của PCR điểm cuối định lượng truyền thống, Real-time Q-PCR đã được giới thiệu. Theo lý thuyết, sự sản sinh các sản phẩm PCR nên đạt tới hàm số mũ. Tuy nhiên, trong thực tế nó đạt tới trạng thái bình ổn ở khoảng 30-40 chu kỳ, bởi vì thành phần phản ứng trở nên giới hạn [47]. Với PCR định tính, các sản phẩm của phản ứng được đo tại điểm đơn trong dữ liệu phản ứng. Đồ thị nồng độ của các sản phẩm xuất hiện tại điểm này như là hàm số của lượng ADN ban đầu có mặt ở mỗi phản ứng đó cho thấy rằng tỷ lệ giữa nồng độ ADN (vùng động lực) và các sản phẩm PCR tìm thấy vượt qua vùng nồng độ ADN giới hạn, dẫn tới làm mất độ chính xác trong định lượng. Tuy nhiên, theo kinh nghiệm cho thấy rằng nồng độ ADN trong phản ứng Real-time PCR tỷ lệ với số chu kỳ PCR trong suốt giai đoạn lũy thừa của phản ứng PCR [102]. Vì vậy, nếu số chu kỳ đạt tới điểm giống nhau trong đường cong sinh trưởng theo số mũ đã được biết, độ chính xác về hàm lượng ADN ban đầu của nó (sau đó là GMOs) có thể được xác định. Real-time PCR cũng nhận biết được số bản sao ADN thấp [30]. Một số máy Real-time PCR tự động hoá thủ tục phân tích và cho phép từng chu kỳ từng chu kỳ kiểm tra cấu trúc vận động của phản ứng, cho phép tính toán nồng độ của trình tự đích. Một vài dạng đã được sử dụng để đánh giá số lượng sản phẩm PCR như: (1) ds-ADN liên kết thuốc nhuộm SYBR Green I; (2) Các máy dò lai hoặc máy dò truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET); (3) Các máy dò thuỷ phân (kỹ thuật TaqMan[®]); (4) Các cột mốc (đèn hiệu) phân tử [30]. Các hệ thống này cũng thừa nhận sự khác nhau giữa các sản phẩm PCR đặc hiệu và không đặc hiệu (ví dụ như 2 mạch mỗi (primer-dimer)) nhờ lai mẫu dò hoặc phân tích đường cong nóng chảy của

các sản phẩm PCR, bởi vì các sản phẩm không đặc hiệu có khuynh hướng tan chảy tại nhiệt độ thấp hơn các sản phẩm đặc hiệu [102].



Người ta đã sử dụng TaqMan® để phân tích 179 sản phẩm thực phẩm chứa đậu tương Roundup Ready (ví dụ như thực phẩm dành cho trẻ em và các sản phẩm ăn kiêng, nước đậu, món tráng miệng, đậu phụ, dầu, mì sợi...). Phương pháp này có độ nhạy, tuy nhiên ADN đậu tương có thể khuếch đại có thể không được nhận biết trong chất béo, dầu và đồ gia vị. Sự biến đổi di truyền của đậu tương Roundup Ready đã phát hiện được trong 34 mẫu, trong đó 8 mẫu có chứa nhiều hơn 1% đậu tương Roundup Ready [57].

Hệ thống ABI Prism 7700, tận dụng TaqMan® trong PCR định lượng tương đối, đã nhận biết được 2pg ngô GM và đậu tương Roundup Ready/gam mẫu ban đầu trong 3 giờ sau khi tách chiết [135]. Kết quả nhận biết sản phẩm PCR trong Real-time sử dụng hệ thống GeneAmp® 5700 Sequence được chỉ ra ở hình 1. PCR được tiến hành ở máy Perkin-Elmer AB5700 SDS (Hệ thống Sinh học ứng dụng, Foster,

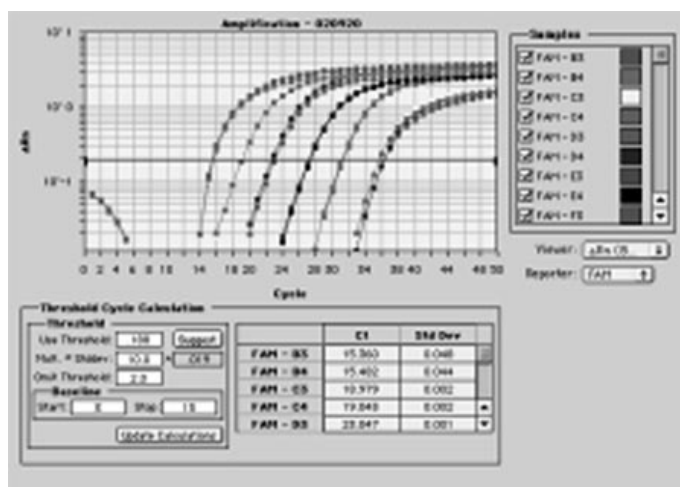
CA). Tín hiệu huỳnh quang của thuốc nhuộm liên kết ds-ADN, SYBR Green I sẽ tăng khi các sản phẩm PCR tăng.

Trên đồ thị đường cong khuếch đại sự tăng số lượng tín hiệu phát quang (ΔR_n), lựa chọn ΔR_n nơi mà tín hiệu phát quang từ cả 2 dung dịch chuẩn đối với đường cong tiêu chuẩn và dung dịch mẫu ADN khuếch đại theo hàm lũy thừa, và kéo theo đường tuyến tính của ngưỡng ban đầu. Sử dụng điểm mà ở đó đường tuyến tính của ngưỡng ban đầu và tín hiệu phát quang của dung dịch chuẩn đối với điểm đánh dấu của đường cong tiêu chuẩn, như là chu kỳ ngưỡng ban đầu (C_t).

Chúng ta có thể vẽ ra đường cong tiêu chuẩn (hình 1) và tính nồng độ ADN của các mẫu nhờ C_t của chúng trong real-time PCR. Hệ thống thừa nhận sự khác nhau giữa các sản phẩm đặc hiệu và không đặc hiệu (ví dụ 2 mạch mỗi) nhờ phân tích đường cong nóng chảy của các sản phẩm PCR, bởi vì các sản phẩm không đặc hiệu có khuynh hướng nóng chảy ở nhiệt độ thấp hơn các sản phẩm đặc hiệu.

Hình 2 cho thấy sự khuếch đại của gen *EPSPS* trong dung dịch ADN plasmid pha loãng 7 lần chứa gen *EPSPS* sử dụng hệ thống nhận biết ABI Prism[®] 7700 Sequence.

Ở hình 2, sử dụng mẫu dò thủy phân (công nghệ TaqMan[®]) để ước tính lượng ADN, mẫu dò bổ sung 1 phần với trình tự đích, gen *EPSPS* được đánh dấu bằng thuốc nhuộm FAM và TAMRA như là chất thông báo và dập tắt. Tín hiệu huỳnh quang được sinh ra trong suốt giai đoạn kéo dài của quá trình khuếch đại ADN như là hoạt tính exonuclease của Taq polymerase phân tách điện quang từ các phân tử dập tắt. Số lượng gia tăng của sản phẩm khuếch đại sinh ra trong mỗi chu kỳ.



Hình 2: Sự khuếch đại gen *epsps* trong dung dịch ADN plasmid pha loãng 7 lần mà có chứa gen *epsps*, sử dụng hệ thống nhận biết ABI Prism[®] 7700 Sequence

1.4.1.4. Kỹ thuật Southern Blot

Kỹ thuật này gồm các bước: cố định ADN đã tách chiết vào màng nylon hoặc nitrocellulose, đánh dấu mẫu dò với các mẫu dò acid nucleic đã đánh dấu mạch kép (ds – double-strADNed) đặc hiệu với GMOs, và nhận biết quá trình lai nhờ tia X-quang, đo độ dày huỳnh quang hoặc sự phát quang nhờ phản ứng hoá học. Các mẫu dò ban đầu được đánh dấu bằng ^{32}P . Tuy nhiên, ADN đã đánh dấu fluoretxein không phóng xạ [107], các mẫu dò ADN đánh dấu biotin hoặc digoxigenin, với độ nhạy tương đương với mẫu dò ^{32}P mà gần đây đã sử dụng, việc phòng ngừa hoạt tính phóng xạ trong phòng thử nghiệm là rất cần thiết. Các mẫu dò không có phóng xạ này đã giảm sự nhận biết tới mức ít hơn 1 giờ, trong khi với ^{32}P là 24 giờ. Tuy nhiên, do chỉ có một mẫu dò được sử dụng và sự khuếch đại không được thực hiện, cho nên phương pháp này có độ nhạy thấp hơn PCR, mà tận dụng ADN của 2 môi.

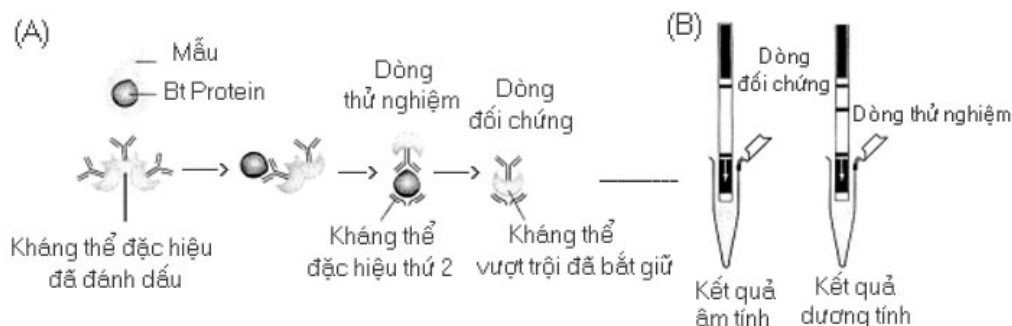
Gần đây, một kỹ thuật Southern blot khác đã và đang được nỗ lực nghiên cứu, thử nghiệm; kỹ thuật này sử dụng thuốc nhuộm tia hồng ngoại gần (phát ra ở 700 và 800 nm) đã kết hợp với nhóm phản ứng lại với carbodiimide và đã gắn trực tiếp với ADN trong phản ứng 5 phút. Các tín hiệu đối với cả 2 loại thuốc nhuộm đã được phát hiện đồng thời nhờ hai thiết bị nhận biết hình ảnh tia hồng ngoại, một số thứ vẫn không thể nhận biết với các kỹ thuật nhận biết thông qua chất phóng xạ thông thường hoặc sự phát quang nhờ phản ứng hoá học [62].

1.4.2. Kỹ thuật nhận biết GMOs dựa trên cơ sở protein

Phân tích miễn dịch là ý tưởng để nhận biết nhiều loại protein trong các mẫu phức hợp khi mục đích phân tích đã được xác định [96]. Cả hai loại kháng thể đơn dòng (đặc hiệu cao) và đa dòng (thường nhạy hơn) có thể được sử dụng phụ thuộc vào lượng cần dùng, hệ thống nhận biết đặc hiệu, ứng dụng riêng biệt và phân bố thời gian để thử nghiệm và chi phí. Trên cơ sở các nồng độ đặc trưng của vật liệu chuyển gen trong mô thực vật (nhiều hơn $10\mu\text{g}/\text{mô}$), giới hạn nhận biết của các phân tích miễn dịch protein có thể dự đoán trước sự xuất hiện của các protein đã biến đổi trong vùng 1% GMOs [121]. Các phân tích miễn dịch với các kháng thể gắn liền với pha đặc đã được sử dụng trong 2 dạng. Dạng thứ nhất là phân tích cách tranh trong máy nhận biết và phân tích hoàn toàn để liên kết với các kháng thể bất giữ. Dạng thứ hai là phân tích 2 vị trí (kháng thể cặp đôi xen vào giữa) trong đó thiết bị phân tích được để vào giữa kháng thể bất giữ và kháng thể nhận biết [44]. Cả hai kỹ thuật phân

tích chất hấp phụ miễn dịch gắn kết enzyme (ELISA) và Western blot đã được sử dụng để phân tích các sản phẩm protein của đậu tương Roundup Ready (dòng chuyển gen của Monsanto) [113].

1.4.2.1. Kỹ thuật phân tích ELISA



Hình 3: Phương pháp phân tích dải chảy bên

(A): Minh họa các nguyên lý của thí nghiệm miễn dịch và sự xác định vị trí tương đối của các dòng thử nghiệm và đối chứng trên dải nitrocellulose

(B): Các dải thí nghiệm đã nhúng chìm trong ống eppendorf có chứa vật liệu biến đổi gen. Một ống có kết quả âm tính và một ống cho kết quả dương tính

Có hai dạng trong phân tích ELISA là: đĩa vi giếng (hoặc dải vi giếng) và ống đã bọc vỏ. Các vi giếng đã bọc kháng thể với các dải 8 – 12 giếng có thể mở được có độ nhạy cao và định lượng được. Để định lượng được thì protein không bị biến tính. Thời gian chạy trung bình đối với phương pháp phân tích đĩa là khoảng 90 phút, và có đầu đọc đĩa thích hợp xác định nồng độ trong các mẫu. Giới hạn nhận biết đối với protein của đậu tương CP4 - EPSPS là 0,25% đối với cây và 1,4% đối với bột đã qua chế biến [146]. Dạng thứ hai thích hợp với thử nghiệm đồng ruộng, với thời gian chạy đặc trưng nằm trong vùng từ 15 – 30 phút. Các ống có thể được đọc hoặc bằng mắt hoặc bằng đầu đọc ống thích hợp và các kết quả là định tính. Do không có tiêu chuẩn nội sinh định lượng trong phân tích, các thông tin bổ sung không thể thu nhận được liên quan đến sự xuất hiện của GMOs ở lượng thành phần có trong thực phẩm [31]. Nguyên lý của phương pháp phân tích dải chảy bên (dạng thứ 2) được chỉ ra ở hình 3.

1.4.2.2. Kỹ thuật dải chảy bên

Kỹ thuật dải chảy bên là một dạng của ELISA (hình 3), sử dụng các dải tốt hơn là các giếng vi chuẩn. Các kháng thể kẹp đã cố định, đặc hiệu đối với protein đã biểu hiện, được cặp đôi với chất phản ứng màu và tích hợp vào dải nitrocellulose. Khi dải được đặt vào ống eppendorff có chứa dịch chiết từ mô thực vật mà có protein chuyển gen thì kháng thể sẽ xen vào giữa một vài kháng thể mà đã kẹp đôi với chất phản ứng màu. Các dòng chảy xen giữa đã nhuộm màu này sẽ chảy đến cuối dải thông qua màng xốp mà có chứa hai vùng bắt giữ, một vùng đặc hiệu với sự kẹp giữa của các protein chuyển gen, một vùng đặc hiệu với các kháng thể đã không xử lý mà cặp đôi với chất phản ứng màu. Sự xuất hiện chỉ của một đường kẻ (đối chứng) trên màng chỉ ra rằng mẫu cho kết quả âm tính. Và nếu có hai đường kẻ thì mẫu đó cho kết quả dương tính. Phương pháp dòng chảy bên cho kết quả trong vòng 5 – 10 phút. Đây là một phương pháp kinh tế, thích hợp với kỹ thuật sàng lọc ban đầu trong chuỗi thực phẩm. Các dải này đã được phát triển để nhận biết nội độc tố đã biểu hiện bởi *Bacillus thuringiensis* mà bảo vệ các côn trùng, ví dụ như CryIA(b) (thường có trong cây, hạt ngô) và protein CP4 EPSPS (có trong đậu tương, cải dầu, bông và củ cải đường) [49, 87]. Các dải chảy bên đã thương mại hoá thường chỉ nhận biết giới hạn trong vài sản phẩm thực phẩm GM, nhưng có những dải có thể nhận biết đồng thời nhiều protein.

1.4.2.3. Kỹ thuật Western blot

Western blot là phương pháp nhận biết định tính hàm lượng protein đích trên hoặc dưới ngưỡng đã xác định trước [87]. Phương pháp này rất thích hợp với việc phân tích protein không hoà tan [39]. Nó cũng thích hợp với nhiều ứng dụng nghiên cứu hơn là đối với thử nghiệm thông thường. Các mẫu để phân tích được hoà tan với các chất tẩy rửa và các tác nhân làm suy giảm, và đã phân tách nhờ điện di gel SDS-polyacrylamide. Các hợp phần đã được chuyển lên màng nitrocellulose, sự liên kết các vị trí globulin miễn dịch trên màng được chặn lại nhờ sữa không béo đã sấy khô. Các vị trí đặc hiệu sau đó được dò với các kháng thể. Sau đó các kháng thể đã liên kết được nhuộm với nitorat bạc (AgNO_3) màu đỏ tươi hoặc màu coma, hoặc chất phản ứng miễn dịch thứ 2, chẳng hạn như protein A đã cặp đôi với horseradish-peroxidase (HRP) hoặc alkaline phosphatase [116]. Giới hạn nhận biết của các phương pháp phân tích Western blot nằm trong khoảng 0,25% đối với hạt và 1% đối với bột đã chế biến [146].

1.4.3. Nhận biết GMOs theo tỷ lệ nhỏ

Do sự bắt buộc của các luật định về GMOs, kể cả gần đây đã có các điều khoản ban đầu và luật dán nhãn hàng hoá, đòi hỏi phải xác định chính xác một lượng rất nhỏ ADN chuyển gen trong mẫu. Các tế bào đơn đã tách chiết nhờ thiết bị đo tế bào dòng chảy hoặc vi thao tác có thể cung cấp đầy đủ lượng ADN để nhận biết GMO dựa trên cơ sở PCR, mặc dù sự khuếch đại các gen bản sao đơn có thể là khó khăn. PCR tế bào đơn có khả năng nghiên cứu các biến dị trong sự biểu hiện gen giữa các tế bào đơn trong quần thể, trong sự biểu hiện gen giữa các kiểu tế bào khác nhau tại các giai đoạn phát triển khác nhau, hoặc có thể được sử dụng với các mục đích chẩn đoán bao gồm cả phát hiện GMOs.

Kỹ thuật nhận biết phân tử đơn (single molecule detection - SMD) tương tự như kỹ thuật phổ huỳnh quang cảm ứng tia laze và kỹ thuật dựa trên sự cộng hưởng từ, để khảo sát các đặc tính vật lý và hoá học của các phản ứng hoá sinh của các phân tử riêng biệt trong real-time, là kỹ thuật tiên bộ nhất trong các kỹ thuật phân tích. Triển vọng trong tương lai đối với SMD để nhận biết và định lượng trực tiếp lượng ADN nhờ tính toán các phân tử đơn trong dung tích siêu vi lượng chứa dịch lỏng, có thể dẫn đến sự phát triển của các kỹ thuật nhận biết GMO theo tỷ lệ nhỏ [97].

1.5. TỔNG QUAN VỀ THIẾT KẾ MÔI, MẪU DÒ ĐỂ NHẬN BIẾT GMOs

Ngày nay, cây trồng biến đổi gen (GMCs) được trồng ngày càng rộng rãi ở rất nhiều nước trên thế giới. Nhưng câu hỏi về sự an toàn trong việc sử dụng các sản phẩm GMCs cũng đồng thời được đặt ra và trở thành một vấn đề nóng bỏng với hàng loạt các vấn đề liên quan xoay quanh. Chính vì thế, việc nhận biết GMCs là cần thiết đối với nhiều ứng dụng như để đánh giá mức độ sạch của hạt giống hay dán nhãn thực phẩm....Nhiều kỹ thuật phân tích đã và đang được phát triển để đáp ứng nhu cầu này. Trong số đó, phương pháp dựa trên cơ sở ADN chủ yếu nhờ vào sự nhân đôi của ADN đặc hiệu với kỹ thuật PCR, phương pháp lai ADN đang được nhiều quốc gia sử dụng. Kỹ thuật này giúp xác định sản phẩm GM với đoạn môi, mẫu dò được thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen chuyển. Do vậy, thiết kế môi cho phản ứng PCR, thiết kế mẫu dò là một bước quan trọng và không thể thiếu được trong việc xác định gen được chuyển vào cây trồng.

Việc thiết kế môi đòi hỏi phải tuân theo một số nguyên tắc chủ yếu. Trước hết, người ta xác định trình tự nucleotide của đoạn gen quan tâm, sau đó đi tìm đoạn ADN có trình tự khoảng từ 15-25 bp ở hai đầu sao cho liên kết bên trong của đoạn tìm được là bền vững nhất. Mặt khác, trình tự của hai đoạn này không có đoạn dài bổ trợ cho nhau và bản thân mỗi đoạn không tự bổ trợ để tránh cho chúng không bị cuộn lại hoặc tự bắt cặp với nhau. Hơn nữa, nhiệt độ bắt cặp của hai đoạn ADN tìm được phải tương đối gần nhau để chúng có thể hoạt động đồng thời. Việc xác định

hai đoạn ADN trên nhằm mục đích tạo ra một cặp môi có khả năng hoạt động hiệu quả.

Các thông số như nhiệt độ nóng chảy của môi, nhiệt độ nóng chảy của đơn vị khuếch đại (thường cao hơn của môi), chiều dài của môi (15-30 bp), chiều dài của đơn vị khuếch đại (trong khoảng 50-10.000 bp), lượng GC trong chuỗi (khoảng 40-60%) là các yếu tố quan trọng trong phản ứng PCR.

Việc lựa chọn chiều dài môi và nhiệt độ nóng chảy của chúng dựa vào một số lý do. Nhiệt độ nóng chảy của môi được định nghĩa là nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ của môi mà sẽ bắt cặp với ADN khuôn và cao hơn nhiệt độ làm môi rời khỏi khuôn ADN. Nhiệt độ nóng chảy cần tăng lên theo độ dài của môi. Môi quá ngắn sẽ làm việc bắt cặp với một số vị trí trên khuôn ADN dài, dẫn đến các bản sao không đặc hiệu. Nói cách khác, chiều dài của môi bị giới hạn bởi nhiệt độ làm nóng chảy nó. Nhiệt độ nóng chảy quá cao (trên 80°C) có thể gây ra một số vấn đề do ADN polymerase ít hoạt động ở nhiệt độ này.

Mẫu dò (Probe) là một sợi nucleic acid (hoặc ribonucleic acid) có trình tự xác định và được đánh dấu bằng các phương pháp khác nhau dùng để nhận diện các đoạn nucleic acid khác có trình tự bổ sung với nó. Quá trình này dựa trên nguyên tắc biến tính và hồi tính của phân tử ADN, được gọi là lai phân tử ADN.

Một số ứng dụng và protocol đòi hỏi mẫu dò có đánh dấu phóng xạ, trong khi một số khác thì chuỗi đích phải được đánh dấu. Trong các ứng dụng đối với mẫu dò thì hai thông số được đưa ra để đánh giá về hiệu suất của chúng đó là độ nhạy và tính đặc hiệu.

Mẫu dò có thể được thiết kế dựa trên những trình tự có sẵn tùy vào mục đích của từng thí nghiệm và các thông tin đã có, ví dụ như: Dựa trên trình tự genome của đối tượng nghiên cứu để nhận diện các bản sao của gen hoặc sản phẩm RNA của gen;

Dựa trên trình tự genome của các sinh vật có quan hệ gần gũi với đối tượng nghiên cứu nhằm tìm kiếm gen chức năng được bảo tồn qua tiến hoá; Dựa trên trình tự amino acid của protein là sản phẩm của gen. Từ đó tìm kiếm trình tự tron vẹn của gen mã hoá cho protein đó trên genome.

Trong quá trình thiết kế mẫu dò cần bảo đảm : Tính đặc trưng của mẫu dò; Không có hiện tượng lai chéo các mẫu dò hoặc tạo cấu trúc không gian nội tại trong mẫu dò; Nhiệt độ biến tính (T_m) phải phù hợp khi thực hiện phép lai nhiều mẫu dò một lúc.

Chiều dài mẫu dò nên nằm trong khoảng 18-50 bazơ và thành phần G-C nên chiếm 40-60 %, tránh các trình tự chứa các bazơ lặp lại nhiều lần (không quá 4 nucleotid lặp lại, ví dụ –GGGG–).

Đã có rất nhiều phần mềm được ứng dụng để thiết kế môi và mẫu dò, chẳng hạn như: Oligo 4, Primer3,... Tháng 9/2003, hãng Invitrogen đã đưa ra phần mềm Vector NTI Advance™ 9.0 . Phần mềm này có thể:

- Phân tích trình tự đã lựa chọn và thiết kế môi PCR cho trình tự đó, dựa trên các thông số như nhiệt độ nóng chảy, %GC và chiều dài đoạn khuếch đại. Đồng thời nó cũng thiết kế được mẫu dò cho lai ADN;
- Phân tích phân tử ADN/ARN và xác định khung đọc mở (ORFs);
- Phân tích phân tử ADN/ARN và xác định các vị trí giới hạn trên phân tử đó;
- Sắp xếp thành hàng các trình tự của hai hoặc nhiều phân tử ADN/ARN;
- Sử dụng để lắp ghép các đoạn ADN (cả các trình tự nguyên bản và sắc phổ) thành trình tự tiếp giáp dài hơn.

1.6. XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU VÀ THIẾT KẾ PHẦN MỀM

1.6.1. Phân loại cơ sở dữ liệu

Việc phân loại cơ sở dữ liệu (CSDL) gắn liền với quá trình nghiên cứu và phát triển CSDL trên thế giới để trả lời hai câu hỏi quan trọng: làm thế nào để tích trữ dữ liệu và tích trữ như thế nào để đạt được hiệu quả cao nhất?. Hiện nay, các nhà nghiên cứu về CSDL đều công nhận loại CSDL quan hệ là có khả năng tốt nhất cả về tích trữ và xuất nhập dữ liệu.

Lịch sử phát triển CSDL đã cho thấy một loại CSDL mới luôn có nền tảng là một loại CSDL đã có. Phương pháp tích trữ dữ liệu đầu tiên được sử dụng trên máy tính là các tệp tin đơn giản (flat files) không chứa đựng bất kỳ một hình thái cấu trúc CSDL nào.

- *Hệ thống tệp tin đơn giản (File Systems)*

Đây là kỹ thuật lưu trữ thông tin bằng các tệp tin và sử dụng cấu trúc của hệ điều hành máy tính. Khái niệm “flat file” là một cách để diễn tả tệp tin dạng text đơn giản, không hề có một cấu trúc riêng nào. Mọi truy cập đều không thể thực hiện được nếu không lập trình một chương trình khác biệt. Các tệp tin khác nhau cũng không được thiết lập một quan hệ nào.

- *Cơ sở dữ liệu dạng cây (Hierarchical Database)*

CSDL dạng cây có cấu trúc hình cây ngược. Các bảng dữ liệu có quan hệ kiểu gia đình. Mỗi bảng con có một bảng bố mẹ duy nhất và một bảng bố mẹ có thể có quan hệ với nhiều bảng con. Bảng con chỉ tồn tại khi đã có bảng bố mẹ. Cấu trúc loại cây này hình thành CSDL dạng cây và cho phép thiết lập quan hệ một- đa phương.

- *Cơ sở dữ liệu dạng lưới (Network Database)*

CSDL dạng lưới là một bước cải tiến từ CSDL dạng cây. CSDL dạng này cho phép bảng dữ liệu con có quan hệ với nhiều bảng bố mẹ. Như vậy nó cho phép thiết lập quan hệ đa phương.

- *Cơ sở dữ liệu quan hệ (Relational Database)*

Khái niệm CSDL dạng quan hệ được thiết lập trên cơ sở CSDL dạng cây nhưng không bắt buộc phải theo đúng hạn chế bảng con phải có bảng bố mẹ. Bất cứ bảng dữ liệu nào cũng có thể được truy cập trực tiếp mà không cần phải thông qua bảng bố mẹ. Điều này cải thiện đáng kể tốc độ truy cập vì không cần phải thông qua tất cả các bảng dữ liệu bậc cao hơn. Điểm thuận lợi nữa là có thể thiết lập quan hệ giữa hai bảng dữ liệu bất kỳ.

Các cơ sở dữ liệu hiện nay trên thế giới đều được thiết kế theo dạng CSDL quan hệ.

1.6.2. Tổng quan về vấn đề xây dựng cơ sở dữ liệu và thiết kế phần mềm

Trên thế giới hiện nay có rất nhiều hệ thống cơ sở dữ liệu (CSDL) về sinh vật biến đổi gen (GMOs) mà trong đó quan trọng nhất là ba CSDL của Mỹ, Châu Âu và Nhật bản. Điển hình là Trung tâm Quốc gia về Công nghệ Tin Sinh học (the National Center for Biotechnology Information, NCBI) trực thuộc Viện Quốc gia về Y học (the National Institutes of Health, NIH), Bethesda, Maryland. Từ năm 1988 và trong những năm gần đây CSDL này đã có tốc độ phát triển vượt quá dự báo của nhiều người. Hiện nay GenBank chứa đựng hơn 30 triệu dữ liệu về chuỗi gen được phân tích từ hơn 130 ngàn loài sinh vật, bao gồm hơn 36 tỉ nucleotit (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>).

Từ những năm giữa thập kỷ 80, GenBank đã hợp tác cả trong lĩnh vực hoạt động, chính sách và trao đổi dữ liệu với hai tổ chức tích trữ gen lớn trên thế giới là: Viện Công nghệ Tin Sinh học Châu Âu (the European Bioinformatics Institute, EBI, thành lập CSDL gen từ năm 1988) và Tổ chức Ngân hàng Dữ liệu Gen Nhật bản (the DNA Data Bank of Japan, DDBJ, bắt đầu năm 1986). Ba tổ chức này đã liên tục trao

đổi dữ liệu gen theo quy định của Tổ chức Hợp tác Dữ liệu Chuỗi Nucleotit Quốc tế (the International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC) và về cơ bản đều bảo trì cùng một CSDL chuỗi gen trong khi việc cập nhập dữ liệu gen vẫn liên tục diễn ra hàng ngày từ các nhà nghiên cứu gen trên toàn thế giới.

Ngoài ba CSDL chính đã nêu trên còn có nhiều Website khác cung cấp khả năng truy cập dữ liệu gen. Một vài Website chứa đựng CSDL toàn diện như của Viện Whitehead Cam (the Whitehead Institute, TIGR) ở Cambridge, Massachusetts; và Viện Chào mừng Hiến máu (the Wellcome Trust Sanger Institute) cũng ở Cambridge, Anh. Các websites khác thì chuyên sâu vào một vài loại gen hay một chủ đề nào đó. Ví dụ WormBase.org chuyên về gen của *Caenorhabditis elegans*, một loại gặm nhấm hay được sử dụng trong các thí nghiệm nghiên cứu; Phòng Thí nghiệm Jackson (the Jackson Laboratory) ở Bar Harbor, Maine, cung cấp thông tin mạng rộng lớn và các công cụ liên quan về gen của loài chuột. Thêm vào đó, có nhiều hệ thống máy tính tự nhân vẫn thường xuyên tải về tất cả các thông tin mới về gen vừa được cập nhập vào các site chính.

Các nghiên cứu về CSDL gen ở Việt Nam hầu như mới bắt đầu trong thời gian gần đây, trong đó CSDL của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh (Cao Thị Ngọc Phượng, 2003) cho phép truy cập các thông tin nghiên cứu trong nước và nước ngoài.

Dù sao thì các thông tin dữ liệu về chuỗi ADN sẽ có rất ít tác dụng nếu không có máy tính và những công cụ phần mềm để phân tích giải mã. Các nhà khoa học nghiên cứu về công nghệ tin sinh học ngay từ khi chuỗi ADN đầu tiên được phát hiện, đã và đang liên tục tạo ra và cải tiến các công cụ phân tích giải mã chuỗi ADN. Trong thời gian sơ khai, họ so sánh các chuỗi amino axit của protein thu được từ các loài khác nhau bằng cách phân lập thành từng đoạn ngắn, rồi xem xét những đoạn đó bằng mắt thường.

Ngày nay, toàn bộ chuỗi gen bao gồm hàng ngàn gen đã được trải ra, và cần có những phần mềm hoạt động trên hệ thống mạng kết nối các máy tính mạnh mẽ nhất để có thể phân tích, so sánh và diễn tả dữ liệu gen và tích trữ kết quả dưới dạng thích hợp cho việc truy cập thông tin. Sau khi sắp xếp mã của toàn bộ một dãy gen, chương trình máy tính sẽ truy xét để xác định các mã dấu, ví dụ như là các dấu bắt đầu và kết thúc của một đoạn gen chứa mã của một protein. Như vậy mã cấu trúc của protein đó có thể được diễn tả và có khả năng giải mã được cả về sinh lý và chức

năng điều hòa của protein đó khi so sánh với các protein đã được biết trước. Sau đó có thể toàn bộ dãy gen cũng sẽ được phân tích để tìm ra cơ chế sinh hóa và phương thức điều hòa.

Rất nhiều các công cụ phần mềm về kỹ nghệ phân tích gen được load sẵn trên các website, thậm chí cả các công cụ đang trên quá trình phát triển như trên website của NCBI, EBI, DDBJ, TIGR, the Sanger Institute và các tổ chức khác (ví dụ danh sách các công cụ của NCBI trên <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/tools/index.html>). Như vậy phần lớn các dữ liệu về gen và các công cụ phân tích có thể được tải về miễn phí cho bất cứ ai có máy tính và kết nối Internet.

Các CSDL trên Internet về gen đã được xây dựng để tích trữ nhiều dạng dữ liệu gen, kể cả amino acid của protein, cấu trúc 3 chiều, các chức năng của protein, mã phân loại sinh vật và tương tác giữa các loại protein. Tài liệu tham khảo về gen cũng được sắp xếp kèm theo cả tóm tắt và được đặt trong trạng thái dễ chia sẻ trên website của Thư viện Y học Quốc gia. Phần lớn các công bố khoa học mới nhất về công nghệ gen dưới dạng điện tử cũng có thể truy cập dễ dàng. Thời gian gần đây, các CSDL Web đã được danh mục hóa và bao gồm cả các dữ liệu thí nghiệm khoa học mới nhất.

Những thí nghiệm đó thường tạo ra khối lượng dữ liệu lớn hơn nhiều so với những gì mà một phòng thí nghiệm đơn độc có thể tự xử lý. Một trong những mục đích của các CSDL gen hiện nay là nhằm giúp các nhà nghiên cứu khác truy cập và tự mình phân tích kết quả. Ví dụ EBI đã tạo ra một Website cho mục đích này (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), và Hiệp hội Dữ liệu về biểu hiện gen nhờ Microarray (the Microarray Gene Expression Data Society) đã được thành lập năm 1999 để khuyến khích việc trao đổi những dữ liệu như vậy (<http://www.mged.org/index.html>).

1.6.3. Tổng quan về nghiên cứu và sự phát triển của mạng Web và CSDL

Mạng Web bao gồm vô vàn máy tính kết nối qua mạng Internet bằng nhiều phương thức khác nhau để chúng có thể truy cập nội dung lẫn nhau. Các CSDL (Databases) trên các máy tính cơ bản là các hệ thống tích trữ các dãy dữ liệu. Thường thì các CSDL này có thể chia sẻ truy cập. Trong thập kỷ qua, sự phát triển vượt bậc của kỹ nghệ tin học Internet cho phép sử dụng công nghệ CSDL trên Web và làm cho việc truy cập thông tin ở các CSDL trên Web trở nên tiện lợi. Do vậy đã xuất hiện cụm từ hệ thống CSDL Web mà thực chất là các hệ thống CSDL mà chúng

cho phép truy cập thông tin qua mạng Internet. Điều này không những áp dụng cho việc trình bày thông tin trên Web qua CSDL mà còn cho cả các dịch vụ thương mại Web.

Sự kết hợp giữa CSDL và Internet đã đặt ra một số vấn đề mới. Vấn đề đầu tiên liên quan đến quá trình truy cập và tìm kiếm. Đối với các CSDL thông thường, quá trình tìm kiếm được thực hiện nhờ ứng dụng ngôn ngữ tìm kiếm như SQL. Các CSDL trên Web được thiết kế và xây dựng trên rất nhiều hệ thống khác nhau với các logic khác nhau. Hơn nữa tốc độ trao đổi thông tin trên mạng còn hạn chế. Tất cả những sự khác biệt đó đặt ra cho công nghệ CSDL trên Web những thử thách mới.

Một vấn đề khác cũng liên quan đến phương pháp tìm kiếm là vấn đề khai thác thông tin (data mining). Khai thác thông tin có nghĩa là tìm kiếm các thông tin mới hay phương thức (patterns) mới mà kỹ thuật CSDL trước đây không có. Đối với người truy cập Web thì vấn đề tìm ra thông tin hay phương thức mới rất quan trọng. Do vậy trong kỹ nghệ Web xuất hiện cụm từ Web portal, trong đó những máy tính của người sử dụng truy cập lẫn nhau.

Trước khi thiết kế và xây dựng một hệ thống CSDL Web ai cũng phải trả lời các câu hỏi sau: kết nối giữa CSDL và Web ra sao? Sử dụng phần mềm cơ sở nào? Phương thức chuyển tải các lệnh SQL từ Web đến CSDL như thế nào? CSDL có thể được kết nối với Web qua chương trình trung gian sử dụng ngôn ngữ lập trình như PHP, PERL, Java applets, Visual Basic .NET hay C++.

Vấn đề cần chú ý là hiệu quả của hệ thống CSDL Web, nhất là khi số người truy cập đồng thời có khả năng tăng nhanh.

Như đã đề cập ở trên, CSDL Web có thể bao gồm nhiều kiểu và dạng dữ liệu khác nhau (dạng số, dạng văn bản, dạng hình ảnh, âm thanh, video, v.v.). Đây cũng là đặc điểm khác biệt của CSDL Web so với CSDL thông thường. Vấn đề này yêu cầu phần mềm cơ sở cho CSDL phải có khả năng xử lý và trao đổi các dạng dữ liệu khác nhau.

Cũng do CSDL sinh vật biến đổi gen bao gồm dữ liệu đa dạng nên vấn đề an toàn mạng cũng cần được chú trọng. CSDL và phần mềm quản trị CSDL cần tuân thủ các nguyên tắc bảo mật và an toàn để hệ thống có thể hoạt động tốt trong tương lai.

Tất cả những vấn đề đã nêu ở trên cần được giải quyết khi thiết kế và xây dựng CSDL sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm của chúng.

1.7. ỨNG DỤNG TIN SINH HỌC ĐỂ GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Kể từ khi Phage Φ -X174 được xác định trình tự (1977) cho đến nay, trình tự ADN của rất nhiều loài sinh vật đã được lưu trữ trong các ngân hàng cơ sở dữ liệu gen. Những dữ liệu này sẽ được phân tích để tìm ra những gen cấu trúc (gen mã hoá cho một protein nào đó), cũng như tìm ra qui luật của những trình tự tương đồng giữa các protein. Việc so sánh các gen trong cùng một loài hay giữa các loài khác nhau có thể cho thấy sự tương đồng về chức năng của protein, hay mối quan hệ phát sinh chủng loài giữa những loài này (thể hiện trên cây phát sinh chủng loài (phylogenetic tree)). Với sự tăng trưởng khổng lồ của dữ liệu loại này, việc phân tích trình tự ADN một cách thủ công trở nên không thể thực hiện nổi.

Ngày nay, các chương trình máy tính được sử dụng để giúp tìm các trình tự tương đồng trong bản đồ gen (genome) của hàng loạt sinh vật, với số lượng nucleotide trong trình tự lên đến hàng tỉ. Những chương trình này có thể tìm kiếm những trình tự ADN không giống nhau hoàn toàn do các đột biến nucleotide (thay thế, mất hay thêm các gốc base). Những giải thuật bắt cặp trình tự (sequence alignment) cũng được áp dụng ngay cả trong quá trình xác định trình tự ADN, là kỹ thuật xác định trình tự đoạn nhỏ (shotgun sequencing). Kỹ thuật này đã được công ty Celera Genomics sử dụng để xác định trình tự genome của vi khuẩn *Haemophilus influenza*. Kỹ thuật xác định trình tự hiện nay không thể tiến hành với cả đoạn trình tự ADN lớn (cỡ vài chục nghìn nucleotide trở lên) nên người ta sử dụng xác định trình tự nhỏ để giải mã hàng nghìn đoạn trình tự với kích thước khoảng 600 - 800 nucleotide. Sau đó, những đoạn trình tự nhỏ này sẽ được sắp xếp thứ tự và nối lại với nhau (thông qua việc bắt cặp trình tự ở những đầu gối lên nhau (overlap)) tạo thành một trình tự genome hoàn chỉnh.

Kỹ thuật xác định trình tự đoạn nhỏ tạo ra chuỗi dữ liệu một cách nhanh chóng, nhưng nhiệm vụ sắp xếp lại các mảnh ADN có thể là khá phức tạp cho các genome lớn. Trong trường hợp dự án bản đồ gen người (Human Genome Project), các nhà tin sinh học phải mất hàng tháng đồng thời sử dụng hàng loạt siêu máy tính (các máy DEC Alpha ra đời năm 2000) để sắp xếp đúng trình tự ngắn lại. Xác định trình tự đoạn nhỏ là kỹ thuật ưu tiên sử dụng trong hầu hết các dự án giải mã genome hiện nay và giải thuật lắp ráp genome (genome assembly algorithms) là một trong những lĩnh vực nóng của tin sinh học.

Một khía cạnh khác của tin sinh học trong việc phân tích trình tự là việc tìm kiếm tự động các gen và những trình tự điều khiển bên trong một genome. Không

phải là tất cả nucleotide bên trong một genome đều là gen. Phần lớn các ADN bên trong genome của các sinh vật bậc cao là các đoạn ADN không phục vụ cho một nhiệm vụ cụ thể nào (hoặc do khoa học hiện nay chưa nhận ra) được gọi là những đoạn ADN rác (junk ADN). Tin sinh học còn giúp kết nối dữ liệu giữa các dự án genome và proteomic, ví dụ việc sử dụng trình tự ADN để nhận dạng protein.

1.8. TỔNG QUAN VỀ LẬP BẢN ĐỒ GEN LÚA

1.8.1. Sử dụng chỉ thị SSR trong lập bản đồ gen

Lập bản đồ gen nhằm xác định vị trí các gen trên các nhiễm sắc thể. Đây là một bước then chốt trong việc tìm hiểu về nguyên lý di truyền của các sinh vật cũng như để chữa các bệnh di truyền. Có hai loại “lập bản đồ gen” đó là: Bản đồ di truyền (sử dụng phân tích liên kết để xác định mối quan hệ của hai gen trên một nhiễm sắc thể) và Bản đồ vật lý (sử dụng các kỹ thuật hoặc các thông tin sẵn có để xác định vị trí tuyệt đối của gen trên một nhiễm sắc thể).

Các marker dùng trong xây dựng bản đồ gen gồm có: Các marker hình thái học (dựa vào các đặc điểm hình thái như màu sắc hoa, dạng lá, loại vỏ hạt,...); Các marker tế bào học (dựa vào cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể, như sự mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn, chuyển đoạn,...); Các marker hoá sinh (sử dụng các đại phân tử làm marker hay sử dụng izozyme làm chỉ thị phân tử); Các marker phân tử (như RFLP, VNTR, RAPD, DAF, AP-PCR, ISSR, SSR, SCAR, STS, AFLP, CAPS, SSCP, DASH, chip ADN, giải trình tự,...). Lựa chọn chỉ thị phân tử trong lập bản đồ gen là việc làm rất quan trọng, bởi mỗi loại chỉ có những thuận lợi và hạn chế của nó. Chỉ thị RFLP là chỉ thị đồng trội, có tính ổn định và chính xác cao tuy nhiên lại rất tốn kém và khó thực hiện; sử dụng chỉ thị RADP đơn giản, dễ thực hiện, không tốn kém nhưng kết quả không ổn định và độ chính xác không cao.v.v. Sử dụng chỉ thị SSR để nghiên cứu hệ gen lúa nói chung và lập bản đồ nói riêng là sự lựa chọn hợp lý và tốt nhất; bởi vì chỉ thị SSR dễ thao tác, kết quả chính xác và đối với lúa đã có hàng nghìn chỉ thị sẵn sàng cho sử dụng. Có nhiều loại marker dùng để lập bản đồ gen nhưng hiện nay microsatellites được sử dụng rộng rãi nhất.

Microsatellite hay SSR (simple sequence repeat) là chuỗi mã lặp lại đơn giản, thường xảy ra một cách ngẫu nhiên trong hầu hết các genome trên thực vật. Microsatellite được sắp xếp theo thứ tự lặp lại của các đoạn ADN ngắn (1-6 bp) mà nó biểu hiện sự biến thiên về số lần lặp lại tại một locus. SSR có thể khuếch đại trong

ống nghiệm bằng phương pháp PCR với sự phát triển của mỗi allele theo hai miền của hai bên chuỗi ký tự lặp lại trên một locus.

Do sự đa dạng của nó mà các chỉ thị SSR trở thành nguồn marker di truyền rất có giá trị. Microsatellite được sử dụng rất nhiều trong phân tích genome do tính đa hình phong phú, tiết kiệm thời gian so với các phương pháp khác. Và do là phương pháp rẻ tiền cho nên hiện nay các nhà nghiên cứu đang sử dụng kỹ thuật SSR để thiết kế bản đồ gen trong di truyền.

Các nghiên cứu trước đây về lúa đã đóng góp cho việc phát triển hàng trăm các marker Microsatellite và bản đồ di truyền với 320 SSRs (Wu and Tanksley 1993; Akagi & CS, 1996; Panaud & CS, 1996; Chen & CS, 1997; Temnykh & CS, 2000). Các marker này đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền và để định vị các gen và QTL trên nhiễm sắc thể lúa sử dụng cả lai chéo cùng loài và lai chéo giữa các loài (Xiao & CS, 1998; Bao & CS, 2000; Zou & CS, 2000; Bres-Patry & CS, 2001; Moncada & CS, 2001). SSRs đang ngày càng trở nên hữu ích đối với việc tích hợp các bản đồ vật lý, bản đồ di truyền và bản đồ dựa trên cơ sở trình tự của lúa, chúng trở thành công cụ hiệu quả để liên kết sự biến thiên về kiểu hình và kiểu gen.

Ở Việt Nam đã có những nghiên cứu về lập bản đồ gen kháng rầy nâu và gen kháng mặn trên lúa (Nguyễn Thị Lang & CS, 2001, 2002). Những nghiên cứu về lập bản đồ gen kháng đạo ôn và gen chịu hạn ở lúa mới ở giai đoạn bắt đầu và chỉ dừng lại ở một vài nghiên cứu có tính chất thăm dò.

1.8.2. Tình hình nghiên cứu lập bản đồ gen kháng đạo ôn

Lập bản đồ các gen kháng đạo ôn đã được tiến hành từ năm 1991, đến nay đã có khoảng vài chục gen: gồm các gen chính và các QTL được xác định trên nhiễm sắc thể số: 4, 5, 6, 8, 11 và 12 của lúa (Yu 1991; Zhu & CS, 1992; Wang et al, 1994; Zheng & CS, 1995; Chen & CS, 1999; Fujii & CS, 2000; Zenbayashi & CS, 2002; Sallaud & CS, 2003). Dựa trên kết quả lập bản đồ, ba gen kháng đạo ôn: Pi-1, Pi-2 và Pi-3 đã được quy tụ vào giống lúa Co39, một giống nhiễm nặng với hầu hết các chủng đạo ôn để tạo ra dòng lúa có 3 gen kháng. Dòng lúa này đã thể hiện tính kháng cao với nhiều chủng đạo ôn khác nhau, điều này đã minh chứng cho sự cần thiết của việc lập bản đồ gen trong công tác chọn tạo giống kháng.

Việt Nam được coi là trung tâm của sự đa dạng thực vật trong đó có cây lúa, sự đa dạng này cũng đồng nghĩa với sự đa dạng về nguồn gen quý. Trong số các giống lúa được thu thập và kiểm định ở Việt Nam, rất nhiều giống có khả năng

kháng bệnh đạo ôn cao và chúng thực sự là nguồn gen quý trong tạo giống lúa kháng bệnh nếu như các gen kháng được phân tích và lập bản đồ phân tử. Lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở các giống lúa địa phương Việt Nam chỉ mới ở giai đoạn bắt đầu và mới chỉ dừng lại ở một vài nghiên cứu có tính chất thăm dò, trong khi đó thực tế của công tác chọn tạo giống kháng bằng chỉ thị phân tử lại đang đòi hỏi có bản đồ phân tử của các gen kháng bệnh; đặc biệt là các chỉ thị phân tử liên kết với gen.

1.8.3. Tình hình nghiên cứu lập bản đồ gen chịu hạn

Khả năng chống chịu hạn được đánh giá bằng nhiều chỉ tiêu khác nhau như áp suất thẩm thấu của lá; cấu trúc, hình thái bộ rễ như: độ dài rễ, độ thâm xuyên của rễ, số lượng rễ.v.v. Về bản chất, tính chịu hạn của cây trồng do đa gen qui định; bởi vậy xác định các gen qui định tính chống chịu hạn ở lúa là công việc hiện rất khó khăn. Hiện nay, các nhà khoa học cho rằng có khoảng 200 gen tham gia vào cơ chế kháng hạn ở cây trồng.

Lúa là một trong những cây lương thực có khả năng chịu hạn kém và được coi là cây tương đối nhạy cảm với môi trường bên ngoài. Đối với từng giai đoạn phát triển khác nhau của cây lúa từ lúc nảy mầm đến khi chín, sự thiếu nước cũng gây ảnh hưởng ở mức độ khác nhau. Tính trạng chịu hạn là một tính trạng do đa gen qui định phức tạp mà sự thể hiện của nó ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cây lúa qua nhiều yếu tố như áp suất thẩm thấu, hình thái bộ rễ.v.v.; bởi vậy sự chọn tạo các giống có tính chịu hạn cao qua các đặc tính hình thái là vô cùng khó khăn, tốn kém và không có hiệu quả cao.

Vào những năm gần đây, do sự phát triển không ngừng của công nghệ sinh học cùng với sự ra đời của các chỉ thị phân tử đặc biệt là ở lúa, các nhà khoa học đã thiết lập được một số bản đồ phân tử cho các tính trạng số lượng như: chịu hạn, chịu úng, chịu phèn.v.v. Đối với đặc tính chống chịu hạn bằng sử dụng chỉ thị phân tử như SSR, AFLP, RFLP, SNP.v.v. các QTL kháng hạn đã được định vị ở nhiều loại cây trồng khác nhau cũng như cây lúa (Morgan & CS, 1996; Otoole & CS, 1979; Lilley & CS, 1996; Champoux & CS, 1995; Price & CS, 1997; Yadav & CS, 1998; Zhang & CS, 2000, Tripathy & CS, 2000, Zheng & CS, 1999; Nguyễn & CS, 2000, 2004). Bản đồ QTL một số tính trạng liên quan đến chịu hạn ở lúa đã được thiết lập và công bố trong các công trình nghiên cứu của các tác giả giới như: tính trạng điều khiển thẩm thấu (osmotic adjustment) của Lilley & CS, 1996, Zhang & CS, 1999 và 2001, Robin & CS, 2003); Trạng thái ổn định màng tế bào (cell-membrane stability) của Tripathy

& CS, 2000; Hàm lượng axit abscisic (abscisic acid content) của Quarrie & CS, 1994 và 1997; điều chỉnh khí khổng (stomatal regulation) của Price & CS, 1997; Tình trạng lá (leaf water status) và hình thái rễ (root morphology) của Champoux & CS, 1995, Ray & CS, 1996, Price and Tomos 1997, Yaday & CS, 1997, Ali & CS, 2000; Courtois & CS, 2000, Zheng & CS, 2000, Zhang & CS, 2001, Kamoshita & CS, 2002, Price & CS, 2002.

Các vị trí mang gen kháng hạn đã được định vị và rải đều trên 12 nhiễm sắc thể (Nguyễn Thị Thanh Thuỷ & CS, 2004). Mặc dù nhiều công trình khoa học được công bố về tính trạng chịu hạn; tuy nhiên khả năng chống chịu hạn ở lúa vẫn đang được coi là một đặc tính quan trọng và được đầu tư nghiên cứu, đặc biệt là việc xác định, định vị và phân lập được các gen chịu hạn nhằm phục vụ cho công tác chọn tạo giống bằng chỉ thị phân tử.

Việt Nam là một trong các nước xuất khẩu gạo hàng đầu thế giới, tuy vậy do hệ thống phân phối còn khó khăn nên một bộ phận người dân ở các vùng sâu, vùng xa, vùng cao còn thiếu lúa gạo. Bởi vậy, việc tạo ra các giống lúa có khả năng chịu hạn cao sẽ giải quyết được vấn đề lương thực tại chỗ cho các vùng nói trên. Bên cạnh đó, nó còn góp phần chấm dứt tị nạn du canh - du cư, ổn định cuộc sống cho đồng bào dân tộc thiểu số, chấm dứt nạn phá rừng đang gây ra nguy cơ nghiêm trọng về cân bằng sinh thái.

Trong những năm gần đây, do biến đổi của khí hậu nên nhiều nước trên thế giới, nhiều vùng lãnh thổ bị hạn hán kéo dài gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất nông nghiệp. Việt Nam là một nước ở vùng nhiệt đới gió mùa, lượng mưa trung bình hàng năm khá lớn nhưng phân bố không đều trong năm, các vùng như miền Trung, vùng Trung du và miền Núi vẫn chịu cảnh hạn hán kéo dài ảnh hưởng đến sản lượng cây lương thực đặc biệt là cây lúa. Nhà nước đã và đang tập trung đầu tư cho việc chọn các giống lúa chịu hạn phù hợp với tập quán và điều kiện canh tác ở từng địa phương. Nhiều công trình nghiên cứu về tính chịu hạn ở lúa đã được công bố và một số giống lúa chịu hạn (CH133, CH1, CH2, LC93-1.v.v.) đã được chọn tạo đem lại lợi ích kinh tế xã hội cao. Tuy vậy, phương pháp chọn giống chịu hạn chủ yếu vẫn là truyền thống; tốn nhiều công sức, thời gian và chưa đảm bảo độ tin cậy lâu dài vì sự lựa chọn chỉ được đánh giá bằng các chỉ tiêu hình thái.

Ở Việt Nam, nghiên cứu lập bản đồ QTL kháng hạn ở giống lúa nương sử dụng chỉ thị phân tử do tổ chức Rockefeller tài trợ đã được tiến hành tại phòng Công nghệ

Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học (Nguyễn Đức Thành & CS, 2004). Viện Di truyền Nông nghiệp đang tiến hành các nghiên cứu phân tích di truyền và lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa qua các nghiên cứu của Viện đã cho thấy nhiều giống lúa chịu hạn địa phương thu thập từ các tỉnh miền núi phía Bắc, miền Trung, miền Nam là nguồn gen chịu hạn tốt làm vật liệu để lập bản đồ gen và khai thác trong chọn tạo giống kháng hạn (Nguyễn Thị Thanh Thuỷ & CS, 2000).

Tuy có nguồn gen chịu hạn phong phú từ các giống lúa địa phương, song sự đánh giá tổng thể, khai thác và sử dụng nguồn gen này phục vụ cho chọn tạo các giống lúa chịu hạn dựa trên bản đồ gen là việc cần phải tiếp tục tiến hành mạnh mẽ hơn nữa.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Các dòng, giống sử dụng trong nghiên cứu

- ◆ Mẫu ngô nghiên cứu: sử dụng các dòng ngô chuyển gen (ngô 176, ngô T25, ngô MON 810) và ngô không chuyển gen (giống nếp hồng).
- ◆ Mẫu đậu tương nghiên cứu: là các giống đậu tương không chuyển gen và đậu tương chuyển gen.
- ◆ Mẫu bông và khoai lang chuyển gen.
- ◆ Mẫu thức ăn gia súc thu thập trên thị trường Việt Nam.
- ◆ Giống lúa Dự chiêm, CR203, LC93-1 (giống lúa do Viện Bảo vệ thực vật chọn tạo), Khang dân 18 (giống lúa thuần Trung Quốc).

2.1.2. Các gen sử dụng trong thiết kế các cặp mồi và mẫu dò

Các gen kháng thuốc trừ cỏ *PAT*, *EPSPS*, *Bar*... gen kháng sâu *Bt* (*CryIA(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*) gen kháng kanamicine (*NptII*...) được sử dụng để làm nguyên liệu trong thiết kế các cặp mồi và mẫu dò cho việc nhận biết một số gen phổ biến đã được chuyển nạp vào cây trồng.

2.1.3. Các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR và các bộ kit nhận biết GMOs

Bảng 2: Trình tự các cặp mồi dùng trong phản ứng PCR thông thường

T T	Tên cặp mồi	Trình tự	Gen đích	Kích thước đoạn khuếch đại
1	35S1/35S2	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	Promoter <i>CaMV</i> 35S	195 bp
2	CDPK-cry03/ CDPK-cry04	5'-CTCTCGCCGTTTCATGTCCGT- 3' 5'-	Promoter <i>CDPK</i> (Calcium dependent Protein Kinase)	211 bp

		GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3'	(sense)/ Cry IA(b)(anti-sense)	
3	HS01/ CryCR01	5'-AGTTTCCTTTTTGTTGCTCTCCT-3' 5'-GATGTTTGGGTTGTTGTCCAT-3'	<i>hsp 70</i> (sense)/ <i>Cry IA(b)</i> (anti- sense)	194 bp
4	NOS ^R /NOS ^F	5'-TAATTTATCCTAGTTTGCGCG-3' 5'-TTAAGATTGAATCCTGTTGCCG-3'	<i>T-NOS</i>	192 bp
5	PA01/CM01 Hoặc PA01/CM03	5'-AGATCATCAATCCACTCTTGTGGTG-3' 5'-CACTACAAATGCCATCATTGCGATA -3' 5'-CCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA-3'	<i>Pat</i> (anti-sense)/ Promoter <i>CaMV 35S</i> (sense)	437 bp hoặc 231 bp

Bảng 3: Trình tự các cặp mồi dùng trong phản ứng RT-PCR và multiplex-PCR

Ký hiệu cặp mồi	Gen đích	Sự định hướng	Trình tự	Sản phẩm khuếch đại
1F	<i>CryIA(b)</i>	sense	5'- ATG GAC AAC AAC CCC AAC ATC- 3'	204 bp
1R		antisense	5'- AAA GAT ACC CCA GAT GAT GTC- 3'	
2F	<i>Pat</i>	sense	5'- GAA GGC TAG GAA CGC TTA CG- 3'	262 bp
2R		antisense	5'- GCC AAA AAC CAA CAT CAT GC- 3'	
3F	<i>35S - EPSPS</i>	sense	5'- CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG-3'	447 bp
3R		antisense	5'- CAT GAA GGA CCG GTG GGA GAT-3'	
4F	<i>T-NOS</i>	sense	5'- TTA AGA TTA AAT CCT GTT GCC G-3'	192 bp
4R		antisense	5'- TAA TTT ATC CTA GTT TGC GCG C-3'	
5F ^a		sense	5'- GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT GAG A-3'	104 bp
P1		antisense	5'- TGC GGG ACT CTA ATC ATA AAA ACC CA-3'	

^a : Mồi này đã kết hợp với mồi 4R và P1 để phân tích RT- PCR

+ Các bộ kit sử dụng để nhận biết GMOs

- Bộ kit QuickStix™ *CryIAb/CryIAc*
- Bộ kit QuickStix™ Roundup Ready®
- Bộ kit ECL sử dụng trong đánh dấu mẫu dò để nhận biết gen *CryIAc*

2.1.4. Các phần mềm sử dụng trong nghiên cứu và xây dựng Web

- Phần mềm OLIGO.4 để thiết kế mồi trên trình tự đoạn gen đã biết.
- Phần mềm MAPMAKER/QTL ver.3.0 và MAPMAKER/QTL ver.1.1 được sử dụng để xác định QTL qui định tính kháng đạo ôn và tính chịu hạn ở lúa.
- Microsoft SQL Server 2000 để thiết kế và xây dựng CSDL kể cả module bảo mật và quản trị người sử dụng.
- Microsoft Visual Studio.NET 2003 để lập trình hệ thống bao gồm các module xuất nhập, tìm kiếm biểu thị, xử lý thống kê và lập báo cáo.
- DeveXpress.NET (Developer Express Inc., Las Vegas, Hoa kỳ) là phần mềm hỗ trợ lập trình cho Visual Studio .NET trong việc thiết kế giao diện thân thiện với người sử dụng và biểu thị kết quả.
- VBeXpress.NET version 3.0 (Data Cast System, Inc., Dublin, Ireland) là phần mềm hỗ trợ để xây dựng các chương trình trên nền Net Framework đặc biệt rất tiện lợi khi thành lập các CSDL Stored Procedures.

2.2. HOÁ CHẤT

Các hoá chất sinh học phân tử cần thiết: các hoá chất tách chiết ADN, hoá chất làm PCR, hoá chất chạy gel agarose, gel polyacrylamide...

♦ Hoá chất tách chiết ADN bao gồm các loại như: Tris HCl, EDTA, SDS, NaCl, CTAB, Chloroform, isopropanol, isoamyl alcohol, Ethanol của các hãng Sigma, Merck, Prolabo, ICN, Labscan.

- Đệm tách chiết ADN của mẫu lá cây chuyển gen:

$$\left\{ \begin{array}{l} 200 \text{ mM Tris-HCl pH8} \\ 250 \text{ mM NaCl} \\ 25 \text{ mM EDTA} \\ 0,5\% \text{ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)} \end{array} \right.$$

- Đệm tách chiết I (đối với mẫu thức ăn gia súc):

$$\left\{ \begin{array}{l} 20 \text{ g/l CTAB} \\ 0,1 \text{ M Tris-HCl pH8} \\ 20 \text{ mM EDTA} \end{array} \right.$$

1,4 M NaCl

- Đệm tách chiết II (đối với mẫu thức ăn gia súc):

$$\begin{cases} 5 \text{ g/l CTAB} \\ 0,04\text{M NaCl} \end{cases}$$

- Đệm TE: $\begin{cases} 10 \text{ mM Tris-HCl pH8} \\ 1 \text{ mM EDTA} \end{cases}$

♦ Hoá chất dùng để chạy phản ứng PCR:

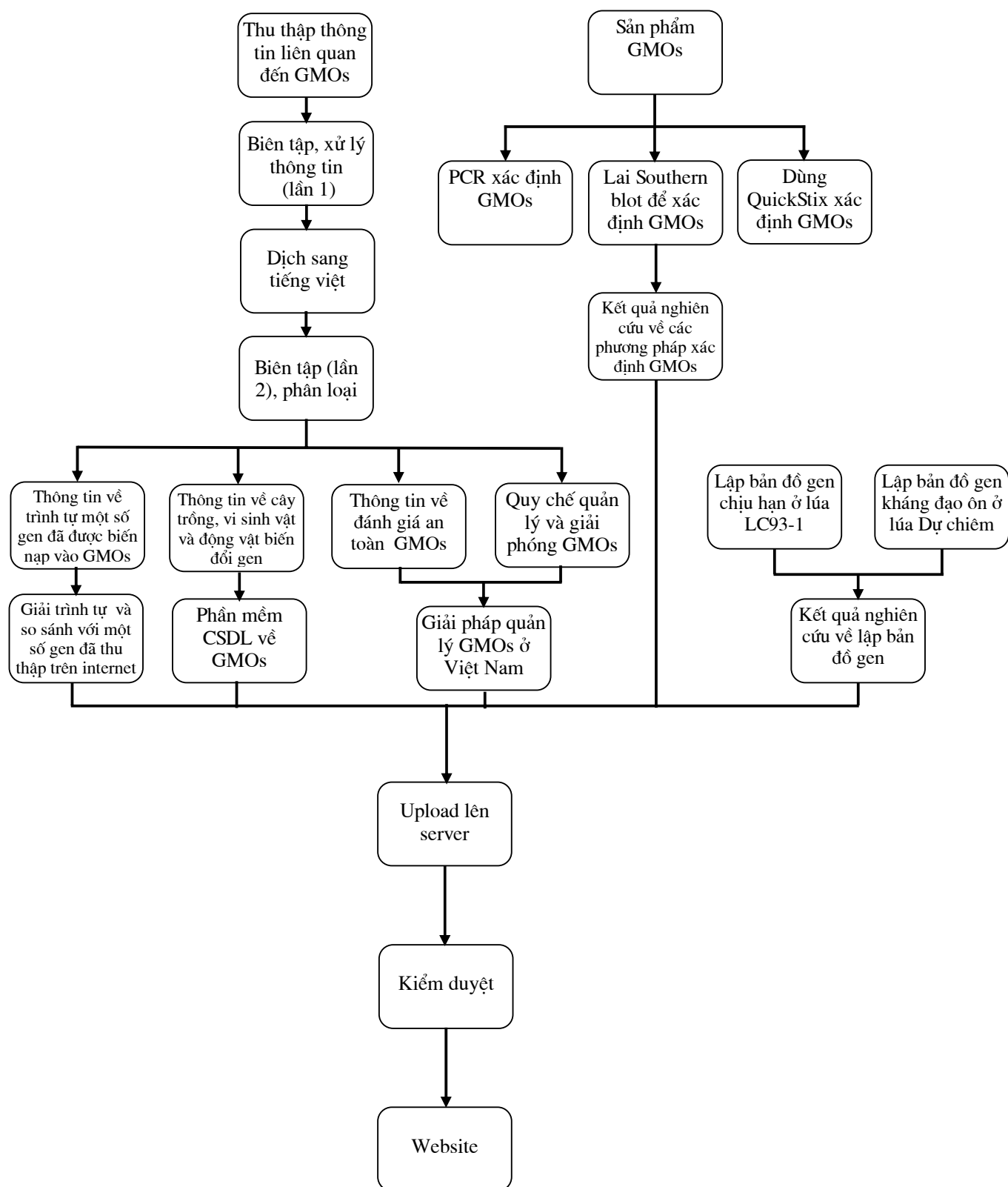
- Đệm PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH8, 1,5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl) hoặc đệm PCR 1X của Quiagen hoặc Invitrogen.
- MgCl_2 của Fermentas, Invitrogen.
- dNTPs (dATP, dGTP, dCT, dTTP (hoặc dUTP)) của Fermentas, Invitrogen.
- Môi, Marker 1 kb, Marker 100 bp, Marker λ /HindIII của hãng Fermentas, Invitrogen.
- Taq polymerase của Fermentas, Hot- Start Quiagen hoặc Platin từ Invitrogen
- Mẫu dò có huỳnh quang của IDT, USA

♦ Hoá chất chạy điện di:

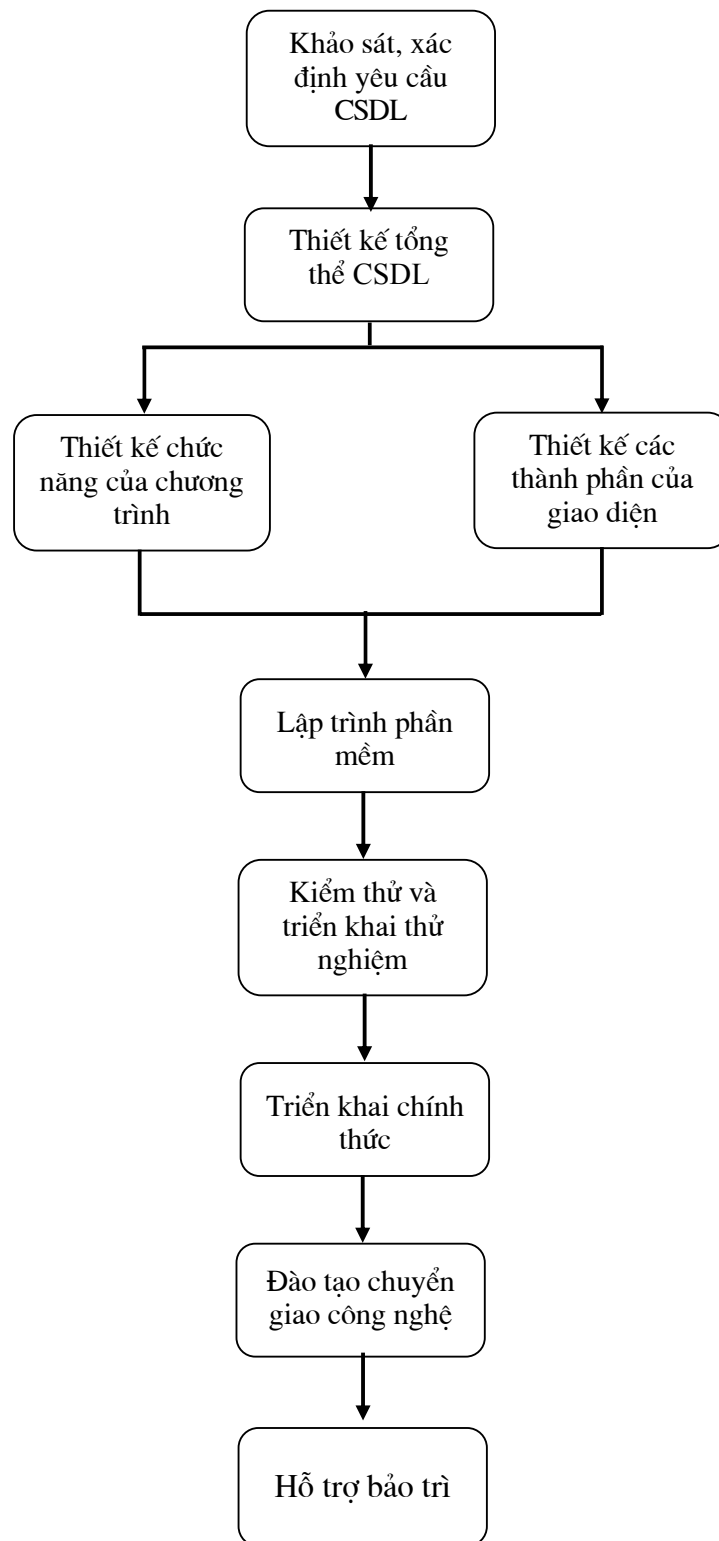
- Điện di gel agarose gồm các hoá chất: TAE (gồm Tris base, EDTA, Acetic acid), Chất nhuộm Bromophenol blue (hoặc Xylene cyanol hoặc hỗn hợp cả 2 chất này), Ethidium bromide, agarose.
- Điện di gel polyacrylamide, bao gồm: Acrylamide, Bis-acrylamide, TBE (gồm Tris base, EDTA, Boric acid) , APS, TEMED, STR (gồm NaOH, formamide, Bromophenol blue, Xylene cyanol), Xylene cyanol, glacial acetic acid, formaldehyde, AgNO_3 , Urê, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Saccarose.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

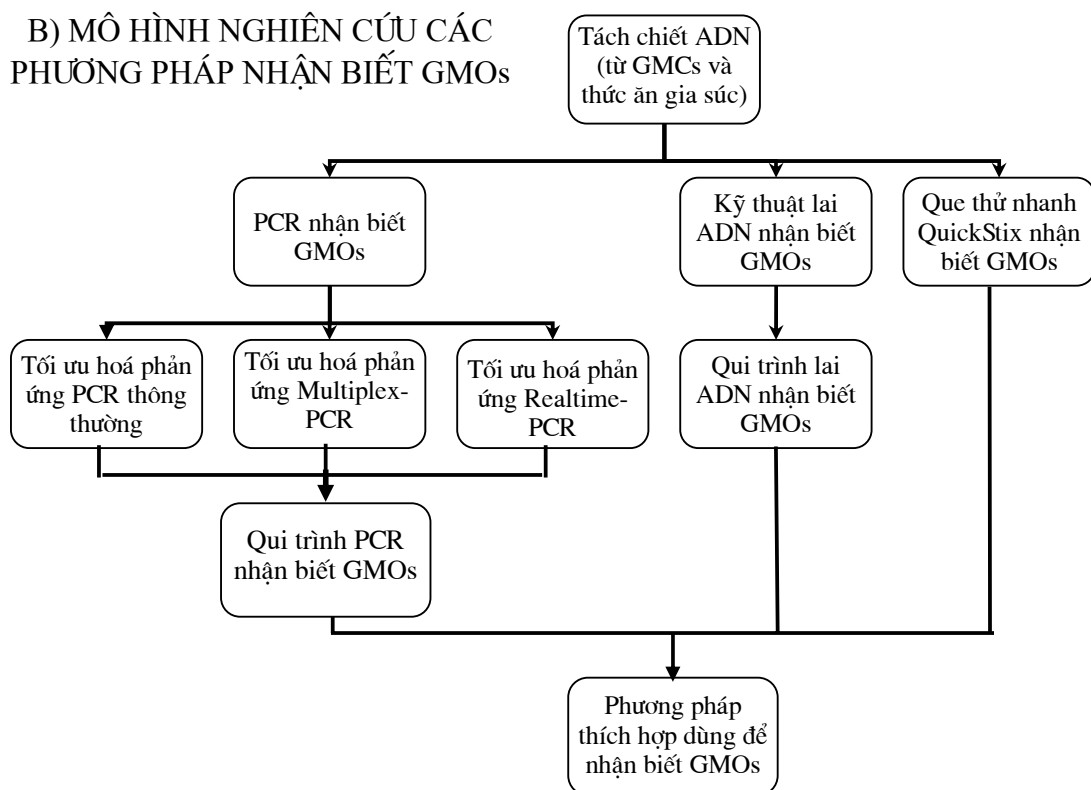
MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU



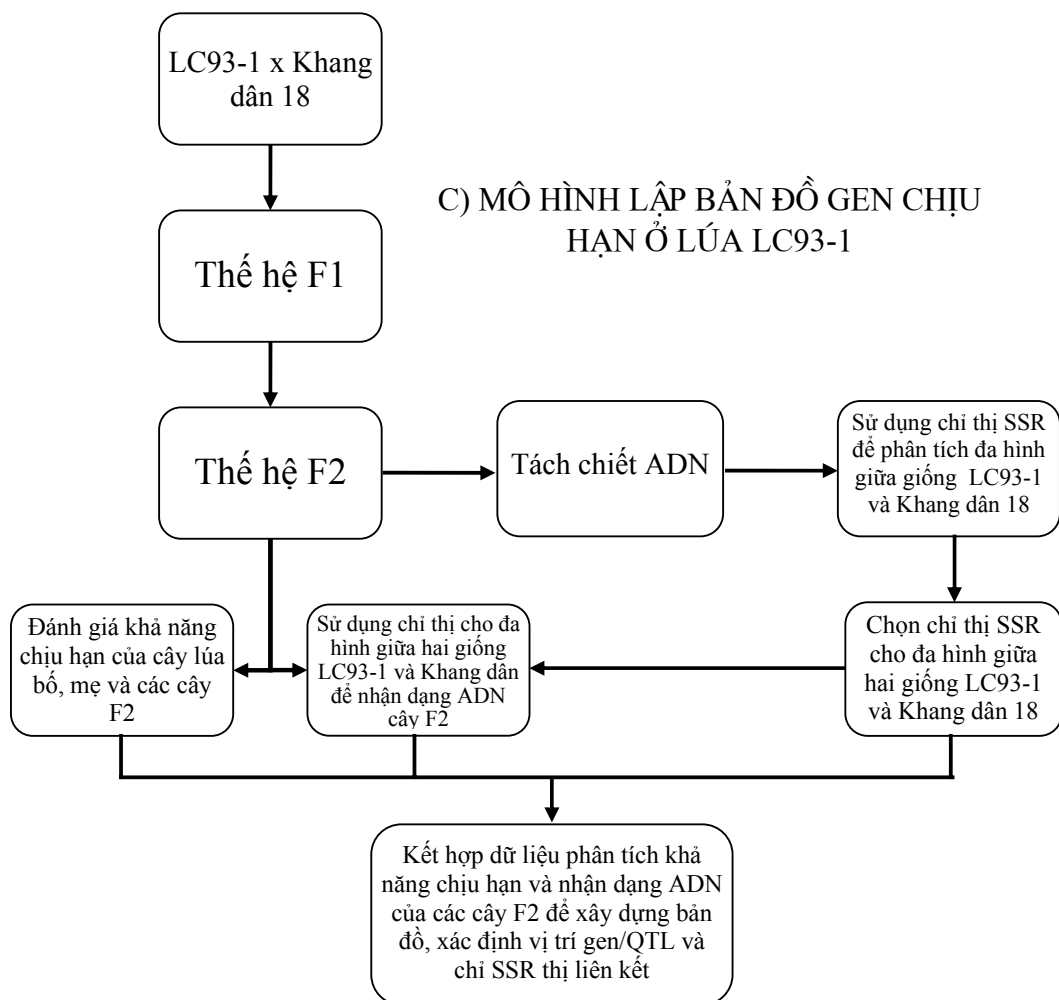
A) MÔ HÌNH XÂY DỰNG PHẦN MỀM

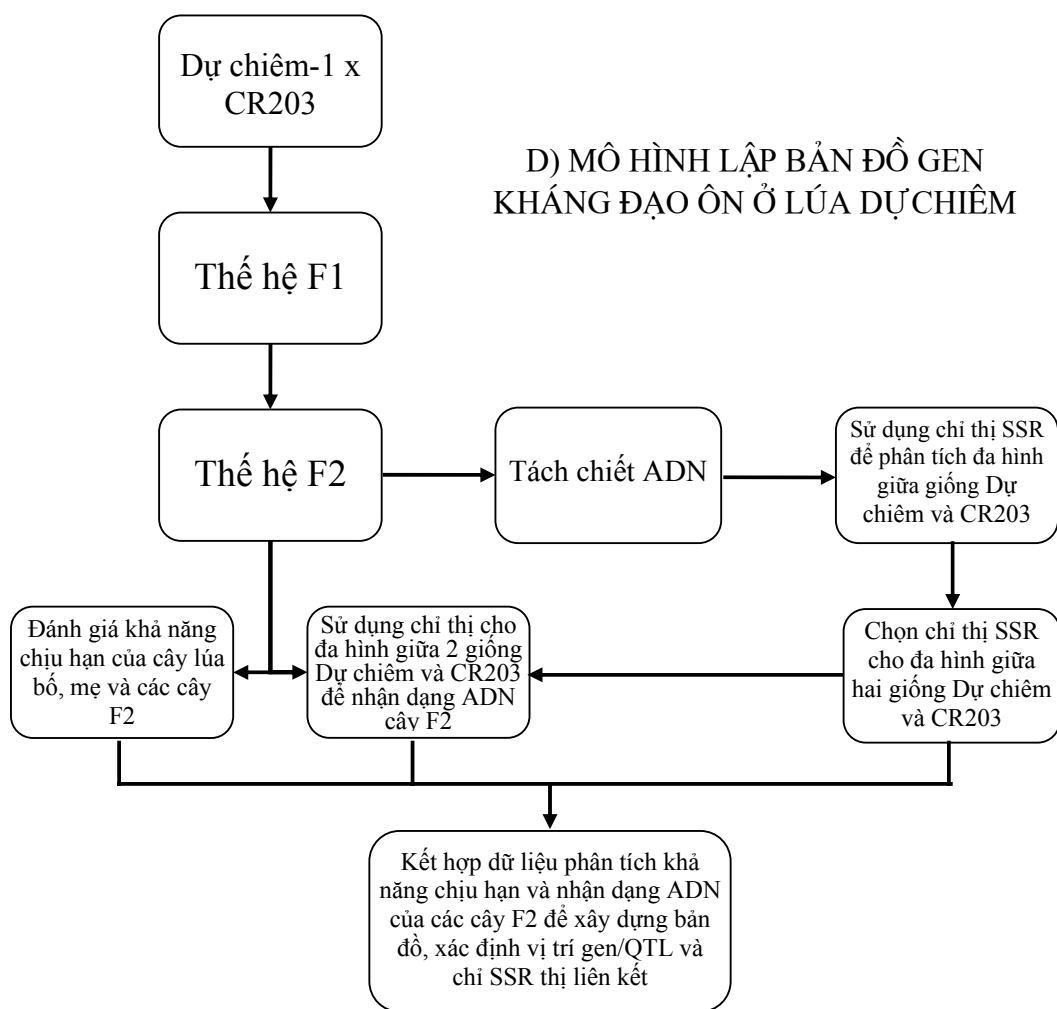


B) MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC PHƯƠNG PHÁP NHẬN BIẾT GMOs



C) MÔ HÌNH LẬP BẢN ĐỒ GEN CHỊU HẠN Ở LÚA LC93-1





2.3.1. Xây dựng cơ sở dữ liệu và thiết kế phần mềm

+ Hệ thống cơ sở dữ liệu về GMOs đã được thiết kế và xây dựng trên cơ sở Microsoft SQL Server 2000 và hệ điều hành Windows Server 2000, còn phần mềm quản lý trên cơ sở Microsoft Visual Studio.NET 2003 trên nền hệ điều hành Windows XP. DeveXpress.NET (Developer Express Inc., Las Vegas, Hoa kỳ) là phần mềm hỗ trợ lập trình cho Visual Studio .NET trong việc thiết kế giao diện thân thiện với người sử dụng và biểu thị kết quả. VBeXpress.NET version 3.0 (Data Cast System, Inc., Dublin, Ireland) là phần mềm hỗ trợ để xây dựng các chương trình trên nền Net Framework.

+ Sử dụng chương trình phân tích so sánh dựa trên nền BLAST version 2.2.5 và ClutalW version 1.8.1. Hệ quản trị CSDL được sử dụng dựa trên MySQL version, tạo phần mềm quản lý đặc trưng, phục vụ cho việc tra cứu và các modul ứng dụng cần thiết đi kèm (Modul hệ thống phân loại, nhập liệu, cập nhật, xử lý thống kê, in ấn, quản trị dữ liệu).

+ Biên tập, phân tích, xử lý, chuyển đổi dữ liệu bằng các phần mềm chuyên dụng, tích hợp, cài đặt phần mềm, kết nối hệ cơ sở dữ liệu vào mạng internet nội bộ. CSDL xây dựng được cũng liên kết với các cơ sở dữ liệu hiện đại trên thế giới AGBIOS, ISAAA, phục vụ công tác truy nhập thông tin nhận biết sinh vật biến đổi gen.

+ CSDL cũng liên kết chặt với CSDL khác như NCBI, DDBJ, Expassy, EMBL-EBI...tiện ích khi cần phân tích trình tự ADN, protein

2.3.2. Thiết kế môi PCR, thiết kế mẫu dò cho việc phát hiện một số gen phổ biến được chuyển vào cây trồng

2.3.2.1. Thiết kế và kiểm tra môi

+ Sử dụng chương trình phần mềm OLIGO.4 để thiết kế môi trên trình tự đoạn gen đã biết. Trình tự của môi khoảng từ 15-25 bp sẽ nằm ở hai đầu đoạn gen được chương trình tối ưu theo các điều kiện sau:

- Liên kết bên trong của đoạn tìm được là bền vững nhất.
- Trình tự của hai đoạn này không có đoạn dài bổ trợ cho nhau.
- Mỗi đoạn không tự bổ trợ.
- Nhiệt độ kết cặp của hai đoạn ADN tìm được tương đối gần nhau.

+ Kiểm tra sự hoạt động của cặp môi mới được thiết kế dựa vào phản ứng PCR và điện di sản phẩm phản ứng, xác định ngược lại trình tự ADN của sản phẩm PCR đó xem có đúng đoạn gen quan tâm không.

2.3.2.2. Thiết kế mẫu dò

+ Thiết kế mẫu dò trên chương trình OLIGO.4, về cơ bản cũng phải thỏa mãn các điều kiện như quá trình thiết kế môi. Trình tự của ADN mẫu dò có thể dài hơn ít nhiều so với trình tự của một đoạn môi (vài chục bp).

+ Tìm nhiệt độ lai

Khi tiến hành lai giữa ADN mẫu dò với ADN khuôn mẫu phải tính toán nhiệt độ lai thích hợp. Chương trình OLIGO.4 sẽ tính toán nhiệt độ lai dựa trên các trường hợp cụ thể:

- Không dùng formamide: nhiệt độ lai thường khá cao, sử dụng đối với mẫu dò đánh dấu bằng phóng xạ.

- Dùng formamide (50%): nhiệt độ lai thấp hơn, sử dụng đối với mẫu dò đánh dấu bằng huỳnh quang.

+ Tiến hành lai ADN mẫu dò với ADN khuôn mẫu để phát hiện gen cần quan tâm.

2.3.3. Phương pháp phát hiện GMOs

2.3.3.1. Phương pháp tách chiết ADN

◆ Quy trình tách chiết ADN của các giống cây trồng chuyển gen dựa theo phương pháp của Hugo & CS (1995) có cải tiến.

Quy trình tách chiết được tiến hành như sau:

- Cắt 1g lá non vào trong ống eppendoff 1,5 ml, bổ sung 200 µl đệm chiết và nghiền. Bổ sung tiếp 200µl đệm chiết và nghiền.
- Cho 400 µl phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1), lắc ngược ống và ly tâm trong 10 phút ở 12.000 vòng/phút.
- Chuyển lớp trên cùng sang ống eppendoff mới và bổ sung 1 thể tích (v/v) dung dịch phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24 : 1), lắc ngược ống rồi ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Chuyển lớp trên cùng sang ống eppendoff mới và bổ sung 1 thể tích Ethanol 100% (v/v), ly tâm 12.000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN.
- Rửa tủa ADN bằng Ethanol 75%, sau đó hong khô tủa trong máy cô chân không hoặc để khô tự nhiên.
- Hoà tan tủa ADN trong 50 µl đệm TE hoặc trong nước cất khử trùng đã loại ion, được ADN stock.

◆ Quy trình tách chiết ADN của các sản phẩm thức ăn gia súc dựa theo Article of the Germany Federal Food Act, Method 24.01.1.

Quy trình tách chiết bao gồm các bước sau:

- Nghiền mẫu trong cối xay và cân 200 mg vào ống ependoff 2 ml, bổ sung 1400 µl đệm chiết I vào và lắc trộn đều.
- Cho vào máy lắc cách thủy ở 60°C trong khoảng 30' ÷ 60', rồi lấy ra lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Lấy ra khoảng 750 µl dịch trên cùng cho vào ống ependoff 2 ml mới và bổ sung 750 µl hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) vào, lắc ngược ống. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

- Lấy ra 650 µl dịch (pha trên cùng) cho vào ống ependoff 2 ml. Bổ sung 1400 µl đệm chiết II và để ở nhiệt độ phòng trong 40 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN, hong khô.
 - Cho vào tủa ADN khoảng 750 µl đệm muối, để trong tủ lắc cách thủy ở 45°C cho đến khi tủa ADN tan.
 - Cho 750 µl hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), lắc nhẹ ngược ống và ly tâm 14.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút.
 - Lấy ra 650 µl dịch trên cùng cho vào ependoff 1,5 ml và bổ sung 650 µl Isopropanol, đặt ở nhiệt độ phòng trong 10 phút (hoặc để qua đêm ở 4°C).
 - Ly tâm 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN.
 - Rửa tủa ADN bằng Ethanol 70% (400µl) , sục tủa ADN lên và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ Ethanol 70%, rửa tiếp bằng 150µl Ethanol 100% và dùng pipet để loại bỏ Ethanol, rồi hong khô tủa ADN.
 - Hoà tan tủa ADN trong 50µl nước cất khử trùng đã loại ion, được ADN stock.
- Sau khi tách chiết xong, kiểm tra nồng độ ADN tổng số nhờ phương pháp điện di trên gel agarose 1% với so sánh là Lambda ADN.

♦ Quy trình tách chiết ADN của các mẫu hạt ngô, đậu tương nghiên nhờ phương pháp CTAB (theo Lipp & CS, 1999)

2.3.3.2. Phản ứng PCR

♦ PCR thông thường:

Các phản ứng PCR được thực hiện trong thiết bị Eppendorf Mastercycler gradient (96 giếng), với thể tích cuối cùng là 25µl / phản ứng.

+ Hỗn hợp phản ứng:

Đệm PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,04 mM
Mồi xuôi và mồi ngược	0,6 µM (cho mỗi mồi)
	1,2 µM (đối với mồi CDPK Cry 03/ CDPK Cry 04 và PA 01/CM 01)

Taq polymerase	1U
ADN	50 ng
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

+ Điều kiện khuếch đại:

- Cặp mồi 35S1/35S2:

- Chu kỳ 1: 94°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
58°C trong 30giây
72°C trong 30 giây
 - Chu kỳ cuối: 72°C trong 6 phút
- } 40 chu kỳ lặp lại

- Cặp mồi NOS^F/NOS^R :

- Chu kỳ 1: 94°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
60°C trong 30giây
72°C trong 30 giây
 - Chu kỳ cuối: 72°C trong 7 phút
- } 40 chu kỳ lặp lại

- Cặp mồi CDPK-cry03/CDPK-cry04:

- Chu kỳ 1: 94°C trong 30 giây
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
63°C trong 30giây
72°C trong 40 giây
 - Chu kỳ cuối: 72°C trong 5 phút
- } 40 chu kỳ lặp lại

- Cặp mồi HS01/Cry-CR01; PA01/CM01 và PA01/CM03:

- Chu kỳ 1: 95°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 95°C trong 20 giây
60°C trong 40giây
72°C trong 1 phút
 - Chu kỳ cuối: 72°C trong 5 phút
- } 40 chu kỳ lặp lại

♦ RT-PCR:

+ Các phân tích real time PCR được thực hiện trong thiết bị Perkin Elmer AB5700 SDS sử dụng hệ thống TaqMan, với thể tích cuối cùng là 25µl / phản ứng.

+ Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

Đệm PCR	1X (Quiagen hoặc Invitrogen)
MgCl ₂	4,5mM
dNTPs	200μM (bao gồm dUTP thay thế cho dTTP)
Mồi xuôi và mồi ngược	300nM
AmpErase	0,3U (các hệ thống sinh học ứng dụng)
Taq polymerase	1,25U (Hot- Start Quiagen hoặc Platin từ Invitrogen)
Mẫu dò có huỳnh quang	250nM (IDT, USA)
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

Các mẫu dò được đánh dấu bằng chất nhuộm thông báo huỳnh quang 6-carboxyfluorescein (FAM) ở đầu 5' và thuốc nhuộm làm tắt huỳnh quang 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) ở đầu 3'.

+ Điều kiện để khuếch đại là:

- Chu kỳ 1: 50°C trong 2 phút
- Chu kỳ 2: 95°C trong 10 phút
- Chu kỳ 3: 95°C trong 15 giây
60°C trong 1 phút. } 45 chu kỳ lặp lại

Các kết quả được phân tích nhờ hệ thống xác định trình tự của hệ thống sinh học ứng dụng PE.

♦ Multiplex-PCR:

+ Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

Đệm PCR	1X
MgCl ₂	1,5mM (đối với gen <i>cryIA(b)</i> và phản ứng multiplex PCR gồm gen <i>EPSPS</i> và <i>NOS</i>)
	2mM (đối với gen <i>Pat</i> và phản ứng multiplex PCR gồm gen zein và <i>35S</i>)
	3mM (phản ứng multiplex PCR gồm gen <i>Bt</i> và <i>Pat</i>))
dNTP	0,2mM (đối với các phản ứng đơn)
	0,3mM (phản ứng multiplex PCR)

Môi	0,4 μ M (đối với các phản ứng đơn)
	0,25 μ M (đối với phản ứng multiplex PCR)
Taq polymerase	1,5U
ADN đích	100ng (mẫu ngô)
	50ng (mẫu đậu tương)
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

Kỹ thuật PCR thông thường được thực hiện trong chu trình nhiệt PTC-96 hoặc Sontec với thể tích cuối cùng là 25 μ l / phản ứng.

Các hoá chất trong phản ứng ở tất cả các trường hợp đều là của hãng Promega, ngoại trừ trường hợp các oligo là của công ty Biosynthesis.

+ Điều kiện để khuếch đại là:

- Chu kỳ 1: 95⁰C trong 5 phút
- Chu kỳ 2: 95⁰C trong 30 giây
- 60⁰C trong 30 giây
- 72⁰C trong 40 giây
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72⁰C trong 3 phút

Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% trong 1 giờ ở cường độ 40mA và đã nhuộm Ethydium bromide.

2.3.3.3. Xác định GMO bằng que thử miễn dịch ELISA

Để tách mẫu mô lá hoặc hạt ngô

1. Kẹp một phần mô lá vào giữa chóp và thân của ống tách chiết mô; đập nắp; tách 2 mô riêng biệt nhờ đóng kín phễu. Đặt lá vào các lỗ, dùng chày đẩy chúng xuống đáy ống.
2. Nghiền các mô bằng cách xoay chày miết vào các thành ống và nghiền xoáy. Quá trình này được thực hiện trong 20- 30 giây, hoặc cho tới khi mô lá nghiền nát. Chú ý: Với hạt, việc nghiền vỡ hạt hoàn toàn giúp cải thiện hiệu quả tách chiết hơn và hiệu suất thử nghiệm.

3. Giữ ống theo chiều thẳng đứng, cẩn thận bổ sung 15 giọt đệm chiết (350 μ l đệm chiết) Quick Stix (dùng cho lá hoặc hạt) vào mỗi ống chứa mô lá ngô.
4. Lặp lại các bước nghiền để trộn đều mô với dịch chiết. Vứt bỏ chày (không được sử dụng chày cho nhiều mẫu). Đối với hạt, đẩy nắp ống lại và lắc nhẹ, rồi để chất lỏng lắng xuống đáy ống.

Chạy kiểm tra dải QuickStix

1. Để các hộp đã làm lạnh đến nhiệt độ phòng trước khi mở hộp. Lấy các dải QuickStix ra, tránh uốn cong các dải. Đậy hộp lại ngay lập tức.
2. Đặt dải vào trong ống tách chiết. Mẫu sẽ di chuyển lên trên dải băng. Sử dụng giá đỡ nhiều ống nếu cần.
3. Để dải băng khuếch trương (mở rộng) trong 5 phút và sau đó kiểm tra kết quả.
4. Nếu muốn dùng lại dải băng hãy cắt và bỏ phần đáy dải băng bao bọc bởi dải mũi tên.

2.3.3.4. Xác định GMOs nhờ kỹ thuật lai phân tử ADN (Southern blot)

Phương pháp nhận biết gen *CryIA(c)* bằng lai phân tử ADN Southern Blot: Sử dụng kỹ thuật RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Theo phương pháp của Southern, (1975). ADN sau khi tách và tinh sạch, lấy 5 μ g để xử lý với enzym giới hạn Bgl II

♦ Xử lý enzym giới hạn.

Trong thí nghiệm lai phân tử ADN (Southern blot), chúng tôi đã sử dụng enzym Bgl II (trình tự nhận biết 6 cặp bazơ nitơ) để xử lý ADN của cây thí nghiệm. Sở dĩ chúng tôi chọn hai enzym này bởi vì chúng không có điểm cắt trong trình tự của gen ngoại lai (*CryIA(c)* và *nptII*).

Lượng ADN đem xử lý là 5 μ g, với thể tích phản ứng là 100 μ l, ủ 1,5 – 2h hoặc qua đêm.

♦ Chạy điện di ADN

Sau khi xử lý enzym, ADN được điện di trên gel agarose 1% ở điện áp 3 volt/cm, thời gian 14 h.

♦ Chuyển ADN lên màng lai (Southern blot)

ADN trước khi chuyển lên màng được làm mất purin trong 0,25M HCl, với thời gian 10 phút. Sau đó gel được biến tính trong hỗn hợp 0,4M NaOH và 1,5M NaCl để chuyển ADN từ mạch đôi thành mạch đơn.

Mục đích của phương pháp là chuyển các mảnh ADN từ gel lên màng mà vẫn giữ nguyên vị trí của nó.

♦ Mẫu dò ADN (ADN probe)

Tách gen *CryIA(c)* từ plasmid pART27 làm mẫu dò. Mẫu dò được biến tính ở nhiệt độ 95°C, trong 5 phút và đánh dấu bằng bộ kit ECL. Nồng độ mẫu dò bổ sung vào dịch lai theo tỷ lệ 10ng/ml dung dịch lai.

♦ Lai ADN trên màng với mẫu dò

Với dung dịch lai ADN bằng bộ kit ECL, nhiệt độ phản ứng tốt nhất là 42°C. Quá trình lai, các ADN của mẫu dò sẽ liên kết với những mảnh ADN trên màng có trình tự bazơ nitơ tương đồng. Phát hiện kết quả lai bằng phương pháp hiện phim theo bộ kit ECL.

2.3.4. Giải trình tự một số gen đã được sử dụng trong biến nạp GMOs

Sản phẩm PCR của các gen này được tinh sạch nhờ xử lý riêng rẽ với ammonium acetate 4M và cồn 100% để loại bỏ môi và các nucleotit dư thừa sau phản ứng. Sau đó kết tủa thu sản phẩm PCR và hoà tan với TE để dùng làm khuôn để giải trình tự. Xác định trình tự ADN được tiến hành theo Protocol sử dụng bộ kit xác định trình tự Bigdye của Applied Biosystems.

♦ Hoá chất:

Big dye: 8 µl (đã pha loãng từ stock với tỷ lệ 1:3)

Buffer 2,5X: 4µl

Môi: 5 µl (0,8 pmol/µl)

Mẫu sequencing: 2 µl (NOS), 3 µl (*CaMV* 35S), 2,5 µl (*Bt*)

H₂O dedion khử trùng: vừa đủ thể tích cuối cùng là 20 µl

♦ Chu trình nhiệt:

Lid: 110 °C

Chu kỳ 1: 95 °C trong 1 phút

2: 95 °C trong 30 giây
3: 50 °C trong 20 giây

25 chu kỳ

4: 60 °C trong 4 phút

♦ **Tinh sạch phản ứng sequencing:**

- Đựng sản phẩm PCR trong ống eppendorf 1,5ml, bổ sung 2 µl EDTA 250 mM, đảo nhẹ nhàng.
- Bổ sung 65 µl ethanol 95 %, dốc ống ngược lại, nhẹ nhàng và giữ ở nhiệt độ phòng 15 phút.
- Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút, sau đó lập tức loại bỏ lớp dịch trên, giữ lại tủa. Rửa tủa bằng ethanol 70% và để khô tự nhiên hoặc cô chân không.
- Bổ sung 10 µl Hi Di Formamide biến tính ở 90 °C trong 3 phút.
- Lấy 5 µl để chạy sequencing.

2.3.5. Ứng dụng tin sinh học để lập bản đồ chỉ thị phân tử các gen có liên quan đến bệnh đạo ôn ở lúa Dục chiêm và tính trạng kháng hạn ở lúa LC93-1

2.3.5.1. Lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dục chiêm

♦ **Tạo quần thể F2**

Hai giống lúa Dục chiêm và CR203 đã được lai với nhau để tạo cây lai F1, cây lai F1 tự thụ để tạo hạt F2. 150 hạt F2 đã được trồng để thu mẫu tách chiết ADN và giá phản ứng bệnh (kháng/nhiễm bệnh).

♦ **Đánh giá tính kháng bệnh**

Các cây lúa bố, mẹ và F2 được bố trí thí nghiệm để đánh giá phản ứng bệnh vào vụ Đông xuân năm 2006 với 3 lần nhắc lại. Phản ứng bệnh của mỗi cây lúa bố mẹ và F2 được đánh giá theo thang điểm của IRRI từ mức kháng đến nhiễm bệnh tương ứng với thang điểm từ 0 đến 9.

♦ **Phân tích ADN**

Lá 4 tuần tuổi của cây lúa bố mẹ và F2 đã được thu để tách chiết ADN. ADN của lá lúa được tách chiết bằng phương pháp sử dụng CTAB của Murray và Thompson (1980).

Nhận dạng ADN của lúa được tiến hành theo phương pháp PCR sử dụng mỗi SSR của McCouch và cs. (2002).

PCR được chuẩn bị với thể tích mỗi phản ứng là 20µl pha trộn gồm:

Thành phần	Nồng độ
ADN khuôn	50ng
Mồi ngược và xuôi	0.5 μ M (với mỗi mồi)
dNTPs	200 μ M
MgCl ₂	1.5mM
Taq polymerase	0,5 U
Buffer (10X)	2 μ l
H ₂ O	Vừa đủ thể tích phản ứng

Chương trình chạy PCR :

Chu kỳ 1: 94 °C trong 5 phút

2: 94 °C trong 1 phút	} 35 chu kỳ
3: 55 °C trong 1 phút	
4: 72°C trong 2 phút	

Chu kỳ 5: 72°C trong 10 phút

Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 3% sử dụng đệm điện di 0,5TBE

♦ *Phân tích dữ liệu*

Dữ liệu về kiểu gen (nhận dạng ADN) và kiểu hình (phản ứng bệnh) được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết di truyền và phát hiện QTL (vị trí chứa gen trên nhiễm sắc thể). Chương trình MAPMAKER/EXP ver 3.0 (Lander & CS, 1987) được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết của các chỉ thị SSR trên nhiễm sắc thể lúa, khoảng cách giữa các chỉ thị SSR được tính bằng đơn vị centimorgan (cM). Các nhóm liên kết chỉ thị SSR và vị trí của nó trên nhiễm sắc thể lúa được xác định dựa vào bản đồ liên kết của các chỉ thị SSR ở lúa (McCouch & CS, 2002).

Chương trình MAPMAKER/QTL ver.1.1 (Lincoln & CS, 1993) được sử dụng để xác định QTL qui định tính kháng đạo ôn ở lúa. Để tìm QTL, những QTL đã được xác định ở những vùng có chỉ số LOD (log-likelihood) lớn hơn 2.0.

2.3.5.2. Lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa LC93-1

♦ *Tạo quần thể F2*

Hai giống lúa LC93-1 và Khang dân 18 đã được lai với nhau để tạo cây lai F1, cây lai F1 tự thụ để tạo hạt F2. 150 hạt F2 đã được trồng để kiểm tra tính chịu hạn và thu mẫu tách để chiết ADN.

♦ **Đánh giá tính chịu hạn**

Các cây lúa bố, mẹ và F2 được bố trí thí nghiệm để đánh giá chịu hạn vào vụ Đông xuân năm 2006 với 3 lần nhắc lại. Biểu hiện của lá khi bị tạo khô của mỗi cây lúa bố mẹ và F2 được ghi nhận và đánh giá theo thang điểm của IRRI từ mức 0 đến 9. Cây lúa bố, mẹ và F2 ở giai đoạn 65 ngày tuổi đã bị tạo điều kiện khô hạn bằng cách rút hết nước và để đất khô, sau 1 tuần (7 ngày) bắt đầu ghi nhận sự biến đổi của lá và theo dõi số ngày lá bị cuốn hoàn toàn của từng cây F2.

♦ **Phân tích ADN và Phân tích dữ liệu:** giống như lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dự chiêm.

2.4. MÁY MÓC THIẾT BỊ

- Máy PCR Eppendorf AQ Mastercycle 22331 Hamburg
- Máy điện di ngang Embi Tec CA 92126 (Anh)
- Máy điện di ngang BIO-RAD GT (Anh)
- Máy ổn nhiệt (Memmert)
- Thiết bị Vortex (Genie 2 và MS1 Minishaker)
- Tủ hút (LABCONCO 47)
- Tủ cấy vô trùng Teltar BH-100 ELANCOURT (Pháp)
- Tủ cấy vô trùng LABCAIRE BS21 6XU (Anh)
- Nồi hấp thanh trùng (05MB1-160T-3 -Nga)
- Cân điện tử Sartorius (Đức)
- Máy đo pH (HANNA 8521)
- Tủ lạnh sâu -20°C (Frigor - Đan Mạch), tủ lạnh 4°C (National-Nhật Bản)
- Máy soi gel (T2201, Sigma), mặt nạ chắn tia UV (Sigma)
- Tủ sấy (Memmert)
- Máy li tâm lạnh (Eppendorf 5810-R và 2K15 Sigma)
- Máy lắc (SI50, Anh)
- Ống Eppendorf, đầu côn các loại, pipetman các loại
- Lò vi sóng (National-Nhật Bản)
- Máy khuấy từ (IKA[®] RH-KT/C)
- Intel server Proliant 370T-G3 (Máy chủ)
- Hệ thống máy tính TECPC/ pentium 4-2,4GHz (6 chiếc)

- Máy in (HP LaserJet-1320)
- Laptop Toshiba M205
- Máy ảnh Canon 7.1
- Máy ly tâm Eppendorf 5415-D

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ THU THẬP THÔNG TIN VỀ SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN

3.1.1. Thông tin về một số cây trồng biến đổi gen

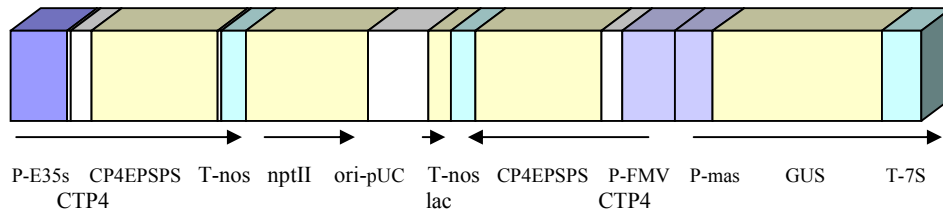
3.1.1.1. Đậu tương biến đổi gen

Đậu tương biến đổi gen là một trong những cây trồng chuyển gen được trồng và thương mại hoá rộng rãi. Trong đó đa phần là các giống đậu tương được biến đổi di truyền để kháng thuốc trừ cỏ và thay đổi hàm lượng axit béo, sau đây là một số giống đậu tương đã được chấp nhận và thương mại hoá ở một số quốc gia.

♦ Đậu tương chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate

- Dòng GTS40-3-2

- Vectơ sử dụng trong biến nạp:



Hình 4: Cấu trúc PV-GMGT04 được sử dụng trong biến nạp dòng GTS40-3-2

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
Hai đoạn gen <i>CP4-EPSPS</i> , kích thước 72 bp và 250 bp, có nguồn gốc từ <i>Agrobacterium CP4</i>	Đoạn promoter 35S tăng cường (<i>E35S</i>) có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ; Đoạn peptit chuyển tiếp của lục lạp (<i>CTP4</i>) có nguồn gốc từ <i>Pentunia</i>	Đoạn <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>Agrobacterium</i>	Gen <i>GUS</i> (<i>beta-D-glucuronidase</i>)	PCR, Western blot, Northern blot, ELISA

- Phương pháp biến nạp: Dùng súng bắn gen.

- Mục đích sử dụng: dùng làm thức ăn gia súc và là sản phẩm tiêu thụ của con người (dầu ăn, bột protein).

- Đánh giá về tính an toàn:

* *Đồng ruộng*: các dòng này an toàn khi trồng cùng với các dòng đậu tương khác và không có khả năng gây ra những rủi ro về dịch hại cây trồng.

Khả năng lai chéo không xảy ra do tính tự thụ của chúng vẫn không bị biến đổi bởi kết quả của cải biến di truyền.

Về tiềm năng cỏ dại, các dòng đậu tương chống chịu glyphosate có thể dễ dàng được kiểm soát nhờ các biện pháp sinh học hoặc nhờ sử dụng các loại thuốc trừ cỏ khác.

* Đa dạng sinh học: tính trạng mới sẽ không được chuyển tới những vùng môi trường không quản lý và không có các đặc điểm kiểu hình mới.

* Giá trị dinh dưỡng: không có dấu hiệu khác nhau về hàm lượng của các thành phần dinh dưỡng giữa các cây chuyển gen và không chuyển gen.

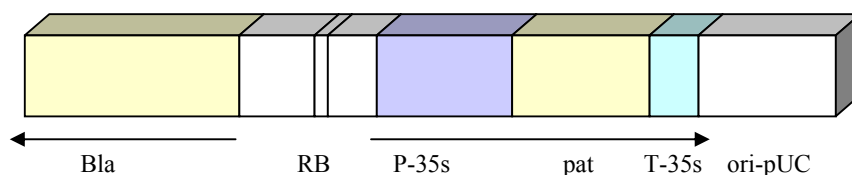
* Đặc tính độc: khả năng gây độc của các dòng đậu tương mang gen này là rất thấp do chúng có sự tương đồng về trình tự axit amin, protein với đậu tương không chuyển gen (đã được chứng minh trên chuột, động vật có vú...).

* Tính gây dị ứng: Có sự tương đồng về trình tự axit amin của protein CP4-EPSPS so với các chất gây dị ứng đã biết. CP4-EPSPS bị phân huỷ nhanh chóng bởi axit hoặc enzym thuỷ phân khi ở trong môi trường dịch vị hoặc dịch ruột của người và động vật.

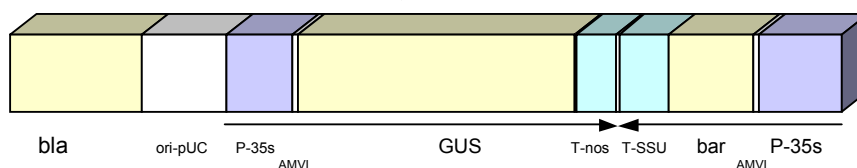
- Các nước chấp nhận và thương mại hoá sản phẩm đậu tương chuyển gen này là: Argentina, Úc, Braxin, Canada, Châu Âu, Nhật Bản, Hà Lan, Nga, Nam phi, Thụy sĩ, Mỹ, Uruguay.

♦ Đậu tương chống chịu thuốc trừ cỏ ammonium-glufosinate

- Tên một số dòng đậu tương: A2704-12, A2704-21, A5547-35, A5547-127, GU262, W62, W98.



Hình 5: Cấu trúc pB2/35SacK sử dụng trong biến nạp các dòng A2704-12, A2704-21, A5547-35



Hình 6: Cấu trúc pWRG2114 sử dụng trong biến nạp các dòng W62, W98

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

+ Dòng A2704-12, A2704-21, A5547-35:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
Gen <i>PAT</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Bản sao 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ (<i>CaMV</i>)	Đoạn tín hiệu Poly-A có nguồn gốc từ <i>CaMV</i> -35S	Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR, Southern blot, ELISA

+ Dòng W62, W98:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>S.hygroscopicus</i>	Bản sao 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ (<i>CaMV</i>)	Không rõ thông tin	Gen <i>gus</i> (<i>beta-D-glucuronidase</i>) có nguồn gốc từ <i>E.coli</i>	PCR

- Phương pháp biến nạp: Dùng súng bắn gen.

- Mục đích sử dụng: dùng làm thức ăn gia súc và thực phẩm tiêu thụ của con người (dầu ăn, bột protein).

- Đánh giá về tính an toàn:

* Đồng ruộng: khi giải phóng ra ngoài môi trường, các dòng này không tồn tại như đặc tính cỏ dại, không ảnh hưởng đến các sinh vật không chủ đích hoặc môi trường nói chung.

* Đa dạng sinh học: không có các đặc điểm kiểu hình mới.

Khả năng lai chéo không xảy ra vì nó vẫn giữ được đặc tính là cây tự thụ.

* Giá trị dinh dưỡng: các thành phần axit amin, axit béo, chất xơ, carbohydrate, protein thô,... của cây chuyển gen cũng giống như đậu tương không chuyển gen.

* Đặc tính độc: phân tích thành phần các chất độc cho thấy chúng cũng có hàm lượng giống như đậu tương bình thường.

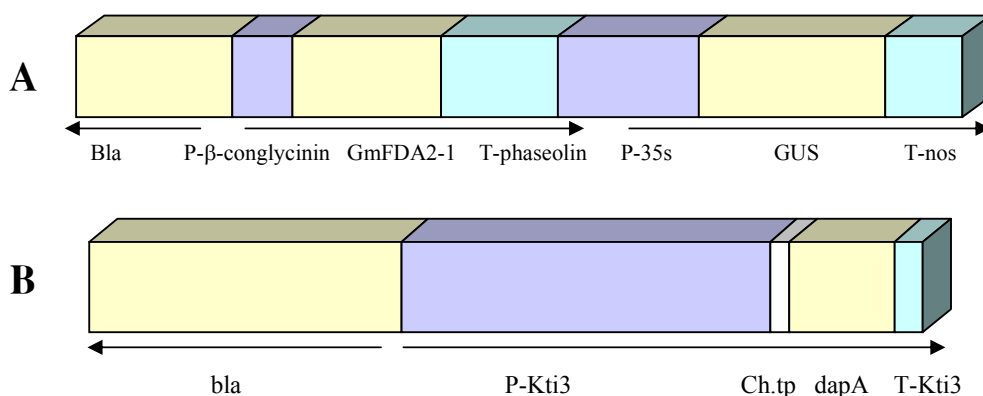
* Tính gây dị ứng: khả năng gây dị ứng của protein *PAT* thấp khi so sánh với các chất gây dị ứng đã biết.

- Các nước chấp nhận và thương mại hoá sản phẩm đậu tương chuyển gen này là: Canada, Nhật Bản, Mỹ (môi trường, dạng thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi).

♦ Đậu tương có hàm lượng axit oleic cao

- Các dòng đậu tương đã được chuyển gen để có hàm lượng axit oleic cao bao gồm: dòng G94-1, G94-19, G168 (là các giống do Dupont tạo ra).

- Gen chuyển vào: là gen mã hoá *GmFad 2-1* của đậu tương (bản sao thứ 2 của enzym khử bão hoà axit béo – gen này mã hoá cho enzym *delta-12 desaturase*, mà nó liên quan đến quá trình tổng hợp axit béo – khi có bản sao thứ 2 của gen này thì sẽ có hiện tượng giống như là ‘gene silencing’, kết quả là cả 2 bản sao của gen khử bão hoà bị ‘switched off’, vì vậy ngăn cản được sự tổng hợp axit linoleic và dẫn đến sự tích lũy axit oleic trong hạt đậu tương).



Hình 7: Hai cấu trúc plasmid pBS43 (A) và pML102 (B) sử dụng để biến nạp các dòng đậu tương G94-1, G94-19, G168

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ	Phương pháp
------------	----------	------------	---------	-------------

			thị	xác định
- Gen <i>GmFad 2-1</i> của đậu tương; - Gen <i>dapA</i> có nguồn gốc từ <i>Corynebacterium glutamicum</i>	- Đoạn promoter 35S đặc hiệu đối với cây có nguồn gốc từ gen β -congly-cinin của đậu tương; - Đoạn promoter <i>CaMV 35S</i> ; - Promoter đặc hiệu với cây ức chế trypsin Kunitz từ đậu tương	- Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' có nguồn gốc từ gen <i>phaseolin</i> của <i>Phaseolus vulgaris</i> ; - Đoạn <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>Agrobacterium</i>	Gen <i>gus</i> (<i>beta-D-glucuronidase</i>) có nguồn gốc từ <i>E.coli</i> ; Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR, Southern blotting

- Phương pháp biến nạp: Dùng súng bắn gen.

- Mục đích sử dụng: dùng làm thức ăn gia súc và thực phẩm tiêu thụ của con người (dầu ăn, bột protein, sợi).

- Đánh giá về tính an toàn:

* Kiểm tra đồng ruộng: Các dòng đậu tương trên đã được thử nghiệm trên đồng ruộng tại Mỹ, Canada, Puerto Rico, Chile...về sản lượng, các đặc tính nông học bao gồm cả tính nhạy cảm với các loại sâu bệnh ... cho thấy chúng đều nằm trong vùng thông thường giống như các dòng đậu tương không chuyển gen.

Các đặc tính như sự tạo phấn và khả năng sống sót không bị thay đổi do biến đổi di truyền và các dòng chuyển gen này vẫn duy trì được khả năng tự thụ phấn giống như các cây đậu tương không chuyển gen.

Về tiềm năng cỏ dại: các dòng đậu tương có hàm lượng axit oleic cao không có đặc tính cỏ dại và không có tiềm năng xâm lấn các dòng đậu tương thương phẩm khác.

Người ta cũng xác định rằng các dòng đậu tương trên không có các tác động có hại đối với các sinh vật có lợi và không có những ảnh hưởng bất lợi đến những loài nguy hại khác.

* *Đa dạng sinh học*: các nghiên cứu cho thấy các dòng đậu tương trên không có các đặc tính kiểu hình mới. Tính trạng mới của các dòng này không truyền sang các loài cây trồng khác trong các môi trường kiểm soát.

* *Giá trị dinh dưỡng*: phân tích các thành phần dinh dưỡng của các dòng đậu tương trên cho thấy các thành phần như protein tổng số, dầu, carbohydrat, sợi thô, axit amin đặc biệt, axit phytic, chất ức chế trypsin, isoflavon... có hàm lượng giống như các giống đậu tương không chuyển gen.

* *Đặc tính độc*: đậu tương có hàm lượng oleic cao có các thành phần như chất béo tổng số, protein, chất xơ, chất tro, axit amin, chất khoáng và vitamin, các nhân tố dinh dưỡng (axit phytic, chất ức chế trypsin, lectin...) và isoflavon không khác với các dòng bố mẹ. Không thấy có các protein mới khác với các protein truyền thống (Các protein đã có tính an toàn) xuất hiện, cho nên các dòng trên hoàn toàn không có tính độc.

* *Tính gây dị ứng*: các nghiên cứu về khả năng gây dị ứng đã chứng minh rằng không có các dấu hiệu khác nhau về chất lượng hoặc số lượng chất gây dị ứng giữa dòng đậu tương có hàm lượng oleic cao và dòng đậu tương thông thường.

- Các nước chấp nhận và thương mại hoá sản phẩm đậu tương chuyển gen này là: Úc, Canada, Nhật Bản, Mỹ.

◆ **Đậu tương có hàm lượng axit linolenic thấp**

- Các dòng đậu tương đã được chuyển gen để có hàm lượng axit linolenic thấp bao gồm: dòng OT96-15 (là dòng do Agriculture & Agri-Food Canada tạo ra).

- Gen chọn lọc: *fan 1*(PI361088B) được chọn lọc qua các thế hệ để làm giảm hàm lượng axit linolenic trong hạt.

- Phương pháp biến nạp: lai chéo theo cách truyền thống để hợp nhất tính trạng mới từ đột biến gen *fan 1* xảy ra 1 cách tự nhiên, từ đó chọn lọc qua các thế hệ được các dòng có hàm lượng axit linolenic thấp.

- Mục đích sử dụng: dùng làm sản phẩm tiêu thụ của con người (dầu ăn, bột protein, sợi thô).

- *Đánh giá về tính an toàn*:

* *Kiểm tra đồng ruộng: các dữ liệu về kiểu hình, đặc tính nông học đã cho thấy rằng chúng giống như các dòng đậu tương thông thường.*

* *Đa dạng sinh học: do dòng này vẫn giữ được đặc tính là cây tự thụ phấn, hiếm khi biểu hiện bất kỳ đặc tính ngủ nghỉ nào cho nên chúng không cạnh tranh với các cây trồng khác.*

* *Thành phần dinh dưỡng: Dòng đậu tương chuyển gen này không được xem xét về thành phần dinh dưỡng ngoại trừ thành phần axit béo. Người ta thấy rằng hàm lượng của các loại axit béo như palmitic, stearic, oleic, linoleic trong dòng đậu tương có hàm lượng linolenic thấp gần như tương đương với dòng bố mẹ và các dòng đậu tương thông thường khác.*

* *Đặc tính độc: người ta thấy rằng không có các protein mới xuất hiện và các tính trạng mới khác cho nên các dòng đậu tương trên hoàn toàn không có tính độc.*

* *Tính gây dị ứng: không có sự xem xét về khả năng gây dị ứng của dòng đậu tương này.*

- Các nước chấp nhận và thương mại hoá sản phẩm đậu tương chuyển gen này là: Canada (chấp nhận ở dạng thực phẩm vào năm 2001).

3.1.1.2. Các dòng ngô biến đổi gen

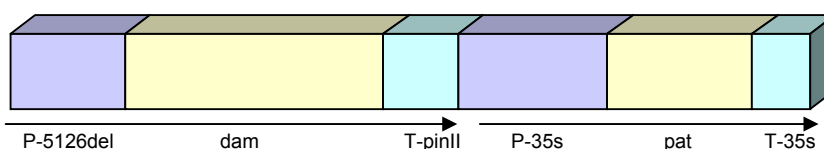
Giống như đậu tương, ngô cũng là cây trồng chuyển gen được thương mại hoá ở nhiều quốc gia. Một số dòng thương mại đã gắn liền với tính trạng biến đổi của nó như ngô *Bt*. Sau đây là thông tin về một số dòng chuyển gen đang được thương mại hoá ở một số quốc gia:

♦ Các dòng 676, 678, 680

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.

- Các dòng ngô 676, 678, 680 được cải biến di truyền để tạo ra dòng ngô bất dục đực. Dòng bất dục đực chứa một gen adenine methylase (*dam*), gen này có nguồn gốc từ *E.coli*. Tuy nhiên khi biến nạp gen *dam* vào thực vật thì sự biểu hiện của nó không rõ ràng trong các cây đã biến nạp. Những dòng này cũng chứa gen marker chọn lọc *PAT*, gen này chống chịu được với thuốc trừ cỏ glufosinate. Dòng 676 chứa một gen *dam* và 2 gen *PAT* (một trong số các gen chèn *PAT* và *dam* là giống nhau). Dòng 678 chứa 3 gen chèn *dam* và 2 gen chèn *PAT* (một trong số các gen *PAT* và

dam là giống nhau. Gen *PAT* khác xuất hiện một phần bản sao. Có ít nhất một bản sao đầy đủ của gen *dam* có mặt trong dòng 678 và một sự sắp xếp lại được tìm thấy ở đầu 3' của một trong số các gen *dam*). Dòng 680 chứa 4 gen *dam* và 1 gen *PAT* đơn (Một trong số các gen *PAT* và *dam* là giống nhau. Ba gen *PAT* khác xuất hiện một phần bản sao của gen *dam*. Một gen *dam* và một gen *PAT* còn nguyên vẹn có mặt trong dòng 680).



Hình 8: Cấu trúc PHP 6710 được sử dụng trong biến nạp các dòng ngô 676, 678, 680

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>PAT</i> có nguồn gốc từ <i>Streptomyces viridochromogenes</i>; - Gen <i>dam</i> (<i>adenine methylase</i>) có nguồn gốc từ <i>E.coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn <i>CaMV 35S</i>; - Đoạn promoter <i>512del</i> đặc hiệu với bao phần có nguồn gốc từ ngô; 	Đoạn <i>T-35S</i> có nguồn gốc từ vi rút khảm súp lơ	PCR, Southern blot, Northern blot

- Các dòng ngô 676, 678, 680 đã được dùng làm thức ăn gia súc và thực phẩm tiêu thụ của con người ở Canada vào năm 1996.

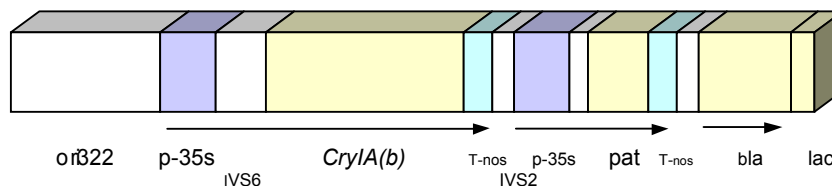
♦ Dòng Bt11: là sản phẩm của công ty Syngenta Seed.

- Phương pháp chuyển nạp: Chuyển ADN trực tiếp vào genome của cây.

- Gen chuyển vào: là *CryIA(b)* và *pat*. Ngô Bt 11 đã được tạo ra để biểu hiện protein *CryIA(b)* - protein nội độc tố δ -endotoxin đối với côn trùng. Protein này có tác dụng tiêu diệt các côn trùng thuộc bộ cánh vảy, kể cả sâu đục thân ngô châu Âu (ECB). ECB là sâu hại chủ yếu ở ngô, nó làm giảm năng suất do phá hại đối với lá, thân, bông cờ. Ngoài ra, Bt11 có chứa gen *pat* - gen này được phân lập từ một loại xạ khuẩn đất *Streptomyces viridochromogenes*. Gen này cho phép sản sinh ra enzyme

phosphinothricine N- acetyltransferase (*PAT*) enzym này có khả năng chống chịu được glufocinate.

Cấu trúc *pZO1502* bắt nguồn từ *pUC18* đã được sử dụng trong biến nạp để tạo ra dòng ngô Bt11:



Hình 9: Cấu trúc *pZO1502* sử dụng trong biến nạp dòng Bt11

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
- Gen <i>PAT</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>Streptomyces viridochromogenes</i> - Gen <i>CryIA(b)</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i>	- Đoạn <i>CaMV35S</i> ; - Đoạn intron <i>IVS2, IVS6</i> từ gen <i>alcohol dehydro-genase</i> của ngô	Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens</i>	Gen <i>bla</i> (<i>betalac-tamase</i>)	PCR, Southern blot, ELISA

- Mục đích sử dụng: Dùng làm thức ăn gia súc và thực phẩm tiêu thụ cho con người.

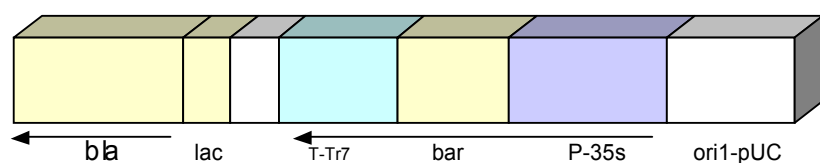
Năm chấp thuận cho phép sử dụng sản phẩm ngô Bt11 ở một số quốc gia:

Quốc gia	Phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm và / hoặc thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Achentina	2001		2001	2001	
Australia		2001			
Canada	1996		1996	1996	
Cộng đồng Châu Âu			1998	1998	1998
Nhật Bản	1996		1996	1996	
Philippine			2003	2003	

Nam Phi	2003	2003			
Thuy Sĩ			1998	1998	
Vương quốc Anh			1998	1998	
Mỹ	1996	1996			

♦ Dòng B16

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.
- Dòng B16 được cải biến di truyền để kháng thuốc trừ cỏ ammonium-glufosinate (hay phosphinothricin), thành phần hoạt tính của thuốc diệt cỏ Basta, Finale, Buster, Harvest và Liberty. Ammonium-glufosinate là một chất diệt cỏ có phổ rộng, không chọn lọc. Nó được sử dụng để kiểm soát cỏ dại sau khi cây mọc hoặc kiểm soát thảm thực vật mọc trên đất mà chúng không sử dụng cho mục đích gieo trồng. Nó có thể bị vi khuẩn phân huỷ ở mức độ cao, không có hoạt tính dư thừa, và mức độ độc tính đối với con người và động vật rất thấp. Khả năng chống chịu glufosinate trong dòng này là do gen *bar*, gen này mã hoá cho enzym phosphinothricin- N- acetyltransferase (*PAT*) mà cho phép các cây trồng này sống sót trong khi mà ứng dụng khác của glufosinate có thể gây chết.



Hình 10: Cấu trúc pDPG165 sử dụng trong biến nạp dòng B16

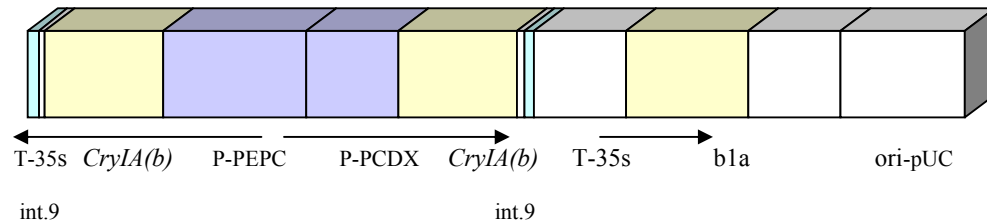
- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>S.hygroscopicus</i>	- Đoạn <i>CaMV</i> - 35S	Đoạn tín hiệu số 7 (<i>Tr7</i>) bản sao T-ADN	Gen <i>bla</i> (<i>betalac-tamase</i>)	PCR, Southern blot

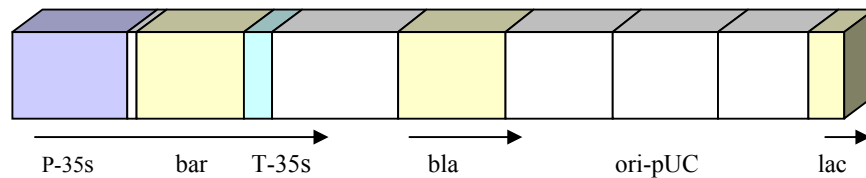
♦ Dòng 176

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.
- Dòng 176 được cải biến di truyền để biểu hiện hai protein nội độc tố delta-*CryIA(b)* của côn trùng. Một protein chống lại côn trùng hại hạt phần ngô và protein kia chống lại côn trùng đục thân ngô. Dòng này cũng được gọi tên là Bt176.

Hai cấu trúc *pCIB4431* và *pCIB3064* đã được sử dụng trong biến nạp:



Hình 11: Cấu trúc *pCIB4431*



Hình 12: Cấu trúc *pCIB3064* (bắt nguồn từ plasmid *apUC*)

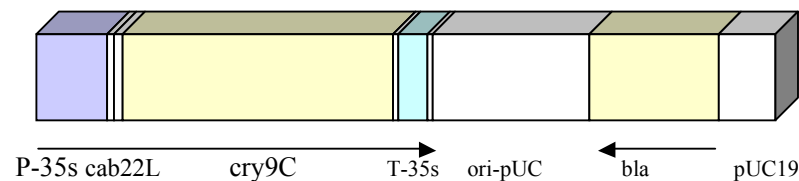
- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
- Gen <i>CryIA(b)</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki</i> ; - Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ	- Bản sao thứ nhất là promoter từ gen <i>phosphoenolpyruvate carboxylase</i> của ngô và terminator <i>CaMV-35S</i> , bản sao thứ 2 là promoter có nguồn gốc từ gen <i>CDPK</i> và	Đoạn tín hiệu Poly-A có nguồn gốc từ <i>CaMV</i>	Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR, Southern blot, Western blot, Northern blot

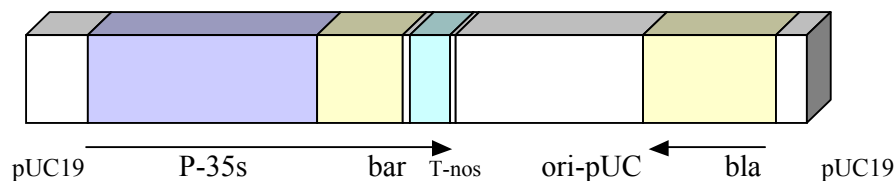
<i>S.hygroscopicus</i>	terminator <i>CaMV</i> -35S - Đoạn <i>CaMV</i> 35S;			
------------------------	--	--	--	--

♦ Dòng CBH – 351

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.
- Dòng này đã được chuyển gen để biểu hiện protein *Cry9C* có tác dụng trừ sâu. Protein này có hiệu quả trong việc kiểm soát ấu trùng của sâu đục thân ngô Châu Âu trong toàn bộ mùa sinh trưởng.
- Cấu trúc *pRVA9909* chứa *Cry9C* và cấu trúc *pDE110* chứa gen *bar* đã được sử dụng trong chuyển nạp:



Hình 13: Cấu trúc *pRVA9909* sử dụng trong biến nạp dòng CBH-351



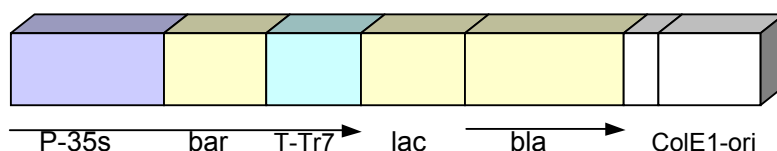
Hình 14: Cấu trúc *pDE110* sử dụng trong biến nạp dòng CBH-351

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

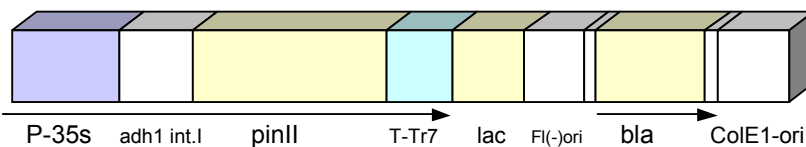
Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ <i>S.hygroscopicus</i>; - Gen <i>Cry9C</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis subsp. Tolworthi</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn <i>CaMV</i>35S; - Trình tự điều khiển của gen <i>cab22L</i> của <i>Pentunia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciensis</i>; - Đoạn tín hiệu Poly-A có nguồn gốc từ <i>CaMV</i> 	Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR

◆ Dòng DBT418

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.
- Dòng ngô DBT418 có khả năng kháng sâu đục thân ngô Châu Âu (ECB), là loại sâu hại chính của ngô nhờ được chuyển gen *CryIA(c)* delta-endotoxin, gen này có nguồn gốc từ *Bacillus thuringiensis subsp. kurstak* chủng HD-73. Dòng này cũng có khả năng chống chịu với ammonium glufosinate (phosphinothricin). Tính kháng ammonium glufosinate là do gen *bar* đã được chuyển vào genome của cây, gen này mã hoá enzym phosphinothricin-N-acetyltransferase (*PAT*). Hai cấu trúc plasmid sử dụng trong biến nạp:



Hình 15: Cấu trúc pDPG165 sử dụng trong biến nạp dòng DBT418



Hình 16: Cấu trúc pDPG320 sử dụng trong biến nạp dòng DBT418

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

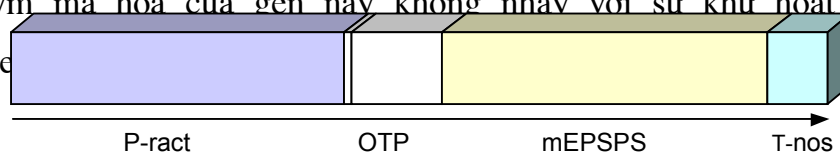
Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ <i>S.hygroscopicus</i>; - Gen <i>CryIA(c)</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki</i>; 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn <i>CaMV35S</i>; - 2 bản sao của octopine synthase (<i>OCS</i>) có nguồn gốc từ <i>Agrobacterium</i> - Gen <i>adh1-int.1</i> (<i>alcohol</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn tín hiệu số 7 (<i>Tr7</i>) bản sao T-ADN; - Đoạn tín hiệu Poly-A và terminator <i>pinII</i> của khoai tây 	Gen <i>bla</i> (<i>betalac tamase</i>)	PCR, ELISA

- Gen ức chế protease (<i>pinII</i>) có nguồn gốc từ khoai tây	<i>dehydrogenase gene-introns I</i> của ngô			
--	---	--	--	--

♦ Dòng GA21

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.

- Dòng GA21 là ngô Roundup Ready, chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate. Glyphosate là 1 loại thuốc trừ cỏ được biết sau này, đây là loại thuốc trừ cỏ có hệ thống phân loại rõ nét mà nó đã được sử dụng rộng rãi để kiểm soát không chọn lọc đối với các loài cỏ dại 1 năm và lâu năm. Dòng GA21 có khả năng kháng thuốc trừ cỏ nhờ chuyển gen *EPSPS* nội sinh của ngô vào genome của cây, enzym mã hoá của gen này không nhạy với sự khử hoạt tính bởi glyphosate



Hình 17: Đoạn ADN của cấu trúc pDPG434 sử dụng trong biến nạp để tạo ra dòng GA21

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

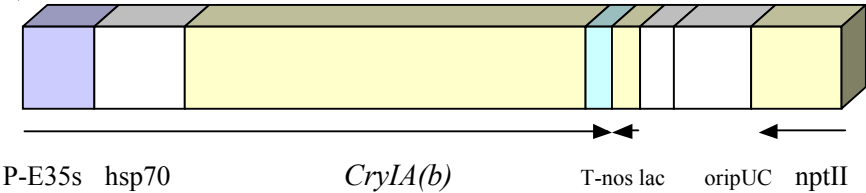
Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
Gen <i>EPSPS</i> của ngô	- Trình tự intron và đoạn promoter actinI của lúa	Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens</i>	PCR, Western blot, Northern blot, Southern blot, ELISA

♦ Dòng Mon832

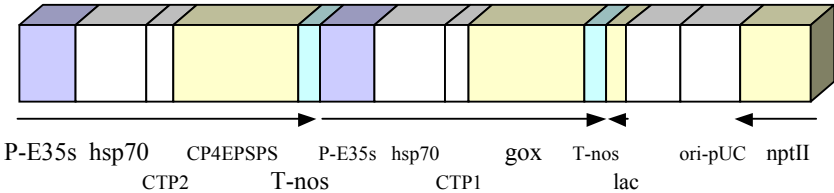
- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.

- Dòng ngô chống chịu thuốc trừ cỏ Mon832 đã được cải tiến di truyền để kháng glyphosate - là thành phần hoạt tính của Roundup®, là thuốc trừ cỏ có hệ thống phân loại rõ nét mà đã được sử dụng rộng rãi để kiểm soát không chọn lọc các giống cỏ hàng năm và lâu năm. Khả năng chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate là do 2 gen *CP4-EPSPS* và *gox* đã được đưa vào genome của cây.

Hai cấu trúc *PV-ZMBK07* và *PV-ZMGT10* đã được sử dụng để biến nạp tạo ra dòng Mon832 (các cấu trúc này cũng đã được sử dụng để tạo ra Mon80100, Mon809 và Mon810).



Hình 18: Cấu trúc *PV-ZMBK07* (Mon832)



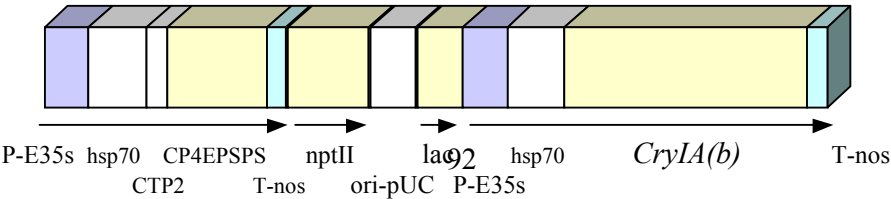
Hình 19: Cấu trúc *PV-ZMGT10* (Mon832)

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
- Gen <i>goxv247</i> (glyphosate oxidoreductase) có nguồn gốc từ <i>Ochrobactrum anthropi</i> ; - Gen <i>CP4EPSPS</i> có nguồn gốc từ <i>A. tumefaciens</i> <i>CP4</i>	- Đoạn promoter 35S tăng cường (<i>E35S</i>) có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ; - Đoạn peptit chuyển tiếp của lục lạp có nguồn gốc từ gen <i>SSU1A</i> của <i>A. Thaliana</i> (<i>CTP1</i>) và gen <i>EPSPS</i> của <i>A. Thaliana</i> (<i>CTP2</i>) - Đoạn intron <i>HSP70</i> của ngô;	Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciensis</i>	Gen <i>nptII</i> (neomycin phosphotransferase II) có nguồn gốc từ <i>E. coli</i>	PCR, Western blot, Northern blot, Souther blot, ELISA

♦ Dòng Mon 802

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.
 - Dòng ngô Mon 802 đã được biến đổi di truyền để biểu hiện protein kiểm soát côn trùng là *CryIA(b)*, protein này có nguồn gốc từ *B. thuringiensis subsp. Kurstaki*, và protein *CP4- EPSPS* và *GOX* có khả năng chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate.
- Ngô Mon 802 được tạo ra nhờ sử dụng các vectơ *PV-ZMGT03* và *PV-ZMBK15*.



Hình 20: Cấu trúc PV-ZMBK15

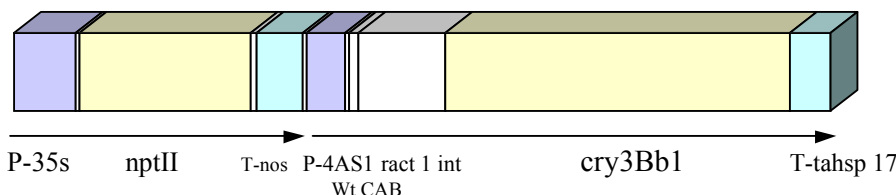
- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>CP4EPSPS</i> có nguồn gốc từ <i>A. tumefaciens CP4</i>; - Gen <i>goxv247</i> (glyphosate oxidoreductase) có nguồn gốc từ <i>Ochrobac-trum anthropi</i>; - Gen <i>CryIA(b)</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringien-sis subsp. kurstaki</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn promoter 35S tăng cường (<i>E35S</i>) có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ; - Đoạn peptit chuyển tiếp của lục lạp có nguồn gốc từ gen <i>SSU1A</i> của <i>A. Thaliana (CTP1)</i> và gen <i>EPSPS</i> của <i>A. Thaliana (CTP2)</i> - Đoạn intron <i>HSP70</i> của ngô; 	Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens is</i>	Gen <i>nptII</i> (neomycin phosphotransferase II) có nguồn gốc từ <i>E. coli</i>	PCR, Southern blot

♦ Dòng Mon 863

- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.

- Mon 863 đã được biến đổi di truyền để biểu hiện protein của côn trùng là *Cry3Bb1* có nguồn gốc từ *B.thuringiensis subsp. Kumamotoensis*. Protein này có hiệu quả trong việc kiểm soát ấu trùng của sâu hại rễ ngô (CRW) (*coleoptera, Diabrotica spp.*).



Hình 21: Cấu trúc PV-ZMIR13L sử dụng trong biến nạp dòng Mon 863

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ	Phương pháp
------------	----------	------------	---------	-------------

			thị	xác định
- Gen <i>cry3Bb1</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis</i>	- Đoạn <i>CaMV 35S</i> với 4 đoạn lặp lại của trình tự hoạt tính (4- <i>ASI</i>) - Đoạn intron actinI của lúa (<i>ract 1 int</i>); - Trình tự dẫn đầu không dịch mã đầu 5' từ protein liên kết với chlorophyll a/b của lúa mì (<i>WtCAB</i>)	- Trình tự không dịch mã đầu 3' của protein sốc nhiệt 17.3 của lúa mì (<i>tahsp17</i>) - Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciensis</i>	Gen <i>npII</i> (neomycin phosphotransferase II) có nguồn gốc từ <i>E. coli</i>	PCR, Souther blot, ELISA

♦ Dòng Mon 80100

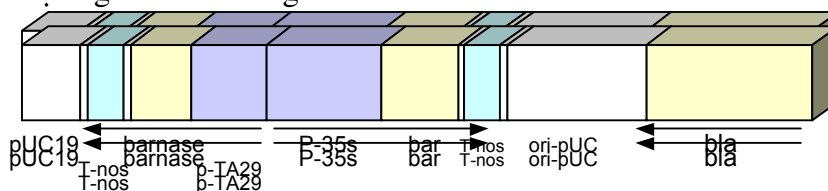
- Phương pháp chuyển nạp: Sử dụng súng bắn gen.

- Mon 80100 là dòng ngô chuyển gen nội độc tố delta-endotoxin *CryIA(b)* mã hoá protein để kiểm soát côn trùng. Protein này là 1 trong các protein trừ sâu mà cũng được biết như là các nội độc tố delta-endotoxin, mà nó được sinh ra trong tự nhiên như là các tinh thể bào tử của *B. thuringiensis subsp. Kurstaki*. Protein này có tác dụng chống lại các côn trùng thuộc bộ cánh vẩy, kể cả sâu đục thân ngô Châu Âu (ECB).

♦ Dòng MS3, MS6

- Phương pháp chuyển nạp: Chuyển ADN trực tiếp vào genome của cây.

- Dòng MS3 và MS6 là 2 dòng ngô chuyển gen *barnase* bất dục đực do SeedLink tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, 2 dòng ngô chuyển gen này gồm có 2 tính trạng biểu hiện: Chức năng bất dục đực nhân trội. Gen thứ hai được chuyển đính kèm là gen *Bar* biểu hiện tính kháng thuốc trừ cỏ glufosinate - ammonium. Các cây bất dục đực đã được ứng dụng trong việc tạo ngô lai có hiệu quả cao, hiện đang được ứng dụng trong chọn tạo ngô lai trên thế giới.



Hình 22: Plasmid *pVE108* được sử dụng để biến nạp tạo ra dòng MS3

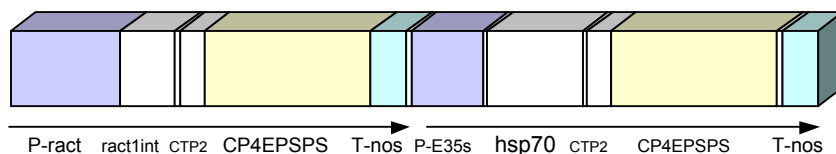
- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen MS3:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
- Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ <i>S.hygroscopicus</i> ; - Gen <i>barnase</i> (barnase ribonuclease) có nguồn gốc từ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	- Đoạn <i>CaMV35S</i> ; - Promoter đặc hiệu với bao phấn <i>pTa29</i> có nguồn gốc từ <i>Nicotiana tabacum</i>	- Đoạn tín hiệu PolyA đầu 3' <i>NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A. tumefaciens</i>	Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR, Southern blot

♦ Dòng NK603

- Phương pháp biến nạp: Chuyển nạp nhờ súng bắn gen.

- Dòng ngô NK603 đã được cải biến di truyền để biểu hiện khả năng chống thuốc trừ cỏ glyphosate. Glyphosate là thành phần hoạt tính trong Roundup®, là loại thuốc trừ cỏ có hệ thống phân loại rõ nét mà nó đã được sử dụng rộng rãi để kiểm soát không chọn lọc các giống cỏ dại 1 năm và lâu năm. Gen *CP4-EPSPS* mã hoá enzym 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*), tạo ra khả năng chống chịu kháng thuốc trừ cỏ glyphosate trên cánh đồng trồng ngô.



Hình 23: Cấu trúc plasmid PV-ZMGT32L đã được sử dụng để tạo ra dòng NK603

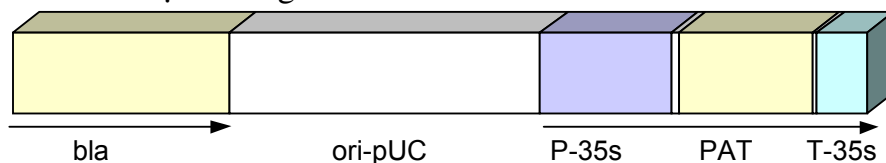
- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
- Hai đoạn gen <i>CP4 EPSPS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens CP4</i> ;	- Đoạn promoter actinI của lúa chứa đoạn intron <i>P-ract1/ract1</i> ; - Đoạn peptit chuyển tiếp của lục lạp có nguồn gốc từ gen <i>EPSPS</i> của <i>A. Thaliana</i> (<i>CTP2</i>); - Đoạn intron <i>HSP70</i> của ngô;	Đoạn tín hiệu Poly-A đầu 3' <i>T-NOS</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens</i>	PCR, Western blot, Souther blot, ELISA

	- Đoạn promoter <i>CaMV 35S</i> tăng cường (<i>E35S</i>)		
--	---	--	--

◆ Dòng T14, T25

- Phương pháp chuyển nạp: Chuyển ADN trực tiếp vào genome của cây.
- T14 và T25 đã được cải biến di truyền để chống chịu ammonium glufosinate (phosphinothricin), thành phần hoạt tính của các loại thuốc trừ cỏ của các hãng Basta, Finale, Buster, Harvest và Liberty. Tính kháng thuốc trừ cỏ ammonium glufosinate có được là do gen *PAT*.



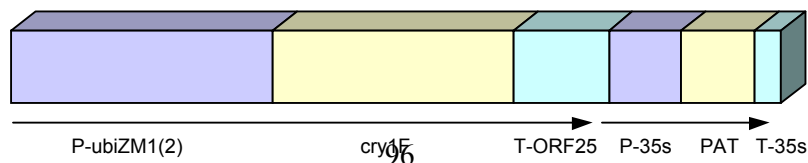
Hình 24: Plasmid *p35S/Ac* đã được sử dụng để tạo ra dòng T14, T25

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
Gen <i>PAT</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Đoạn <i>CaMV35S</i>	Đoạn tín hiệu Poly-A có nguồn gốc từ <i>CaMV</i>	Gen <i>bla</i> (<i>betalactamase</i>)	PCR, Northern blot

◆ Dòng TC1507

- Phương pháp biến nạp: Chuyển nạp nhờ súng bắn gen.
- Dòng ngô TC1507 được cải tiến di truyền để kháng côn trùng và thuốc trừ cỏ glufosinate. Dòng này chứa gen *CryIF* - là protein *CryIF* của côn trùng có nguồn gốc từ *B. thuringiensis* var. *aizawai*. Protein này có hiệu quả trong việc kiểm soát ấu trùng của nhiều loài sâu bọ phổ biến ở ngô chẳng hạn như sâu đục thân ngô Châu Âu, sâu đục thân ngô Tây Bắc, sâu ngài đen, sâu cắn gié. Dòng TC1507 có khả năng chống chịu ammonium glufosinate là do chuyển gen *PAT* vào genome của dòng này.



Hình 25: Plasmid PHI8999A đã được sử dụng để tạo ra dòng TC1507

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
- Gen <i>PAT</i> có nguồn gốc từ <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ; - Gen <i>cryIF</i> có nguồn gốc từ <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	- Đoạn <i>CaMV35S</i> ; - Vùng không dịch mã đầu 5' từ gen ubiquitin (<i>ubi</i>) chứa đoạn intron và exon đầu tiên của ngô	- Đoạn tín hiệu PolyA có nguồn gốc từ <i>CaMV</i> ; - Đoạn tín hiệu PolyA đầu 3' từ ORF25 có nguồn gốc từ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	PCR, Southern blot, Western blot, ELISA

◆ Dòng DBT418 - DK566

- Phương pháp biến nạp: chưa có thông tin.

- Dòng ngô DBT418-DK566 đã được cải biến di truyền để biểu hiện khả năng chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate và kháng côn trùng thuộc bộ cánh vẩy. Glyphosate là thành phần hoạt tính của Roundup®. Gen phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*) quy định tính chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate ở ngô. Tính kháng sâu là do gen *CryIA(b)* quy định, gen này có nguồn gốc từ *B. thuringiensis*.

◆ Dòng DLL25-DK566

- Phương pháp biến nạp: Chưa có thông tin.

- Dòng ngô DLL25-DK566 được cải tiến di truyền để kháng thuốc trừ cỏ glufosinate. Tính chống chịu ammonium glufosinate của DLL25-DK566 là do chuyển gen phosphinothricin-N-acetyltransferase (*PAT*) vào genome của dòng này.

3.1.1.3. Dòng Cà chua FLAVR SAVR™ (*Lycopersion esculentum*) chuyển gen

- Tính trạng: Kìm hãm sự thối nhũn bằng cách ức chế hoạt động của enzym *polygalacturonase*.

- Phương pháp: Chuyển gen gián tiếp vào thực vật nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens*.

- Mục đích sử dụng: sử dụng cho con người ở dạng tươi hoặc đã chế biến. Dòng cà chua chuyển gen này đã được đưa vào thương mại hoá trong những năm gần đây.

Thông tin về công ty: Calgene Inc.

Tổng kết thông tin về các quốc gia sử dụng cà chua FlavrsavrTM:

Quốc gia	Năm phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm và/hoặc thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Canada			1995		
Nhật Bản	1996		1997		
Mexico	1995		1995	1995	
Mỹ	1992	1994			

Ngày nay, cà chua được phát triển thành cây thương phẩm ở 159 quốc gia và tổng sản lượng đạt hơn 98 triệu tấn trong năm 2000. Những nước sản xuất cà chua lớn nhất trong năm 2000 là Trung Quốc, Ai Cập, Ấn Độ, Italia, Thổ Nhĩ Kỳ và Mỹ.

Dòng cà chua FLAVR SAVRTM được chuyển gen để kìm hãm sự mềm nhũn nhờ chuyển bản sao bổ sung của gen mã hoá enzym *polygalacturonase* (PG) có định hướng vào chuỗi antisense, kết quả là làm giảm sự dịch mã của mARN của PG nội sinh. Chuỗi không mã hoá gen polygalacturonase thực chất là bản sao mã ngược của một phần gen PG gốc ở cà chua mà nó ức chế sự biểu hiện của enzyme nội sinh PG trước khi quả bắt đầu chín. Cơ chế của sự giảm hoạt tính của gen PG trong dòng cà chua FLAVR SAVRTM cũng như là mối liên kết về sự lai hoá của chuỗi không mã hoá và chuỗi mã hoá mARN dẫn đến giảm tổng số chuỗi dương tự do của mARN giải mã protein. Sự biểu hiện của gen PG giảm dẫn đến giảm sự phá vỡ của pectin và kết quả là thành tế bào của quả lâu bị phá huỷ, kìm hãm quá trình chín nhũn. Dòng cà chua FLAVR SAVRTM đã cải tiến được kỹ thuật thu hái quả và quá trình chế biến, nó cho phép cây cà chua chuyển gen tồn tại lâu hơn giữ được hương vị tự nhiên, duy trì độ cứng để vận chuyển bằng tàu thủy và sản xuất các sản phẩm

cô đặc trong quá trình chế biến. Hoạt tính của gen nội sinh *PG* tìm thấy ở dòng cà chua chuyển gen FLAVR SAVR™ nhỏ hơn 1% hoạt tính của gen *PG* tìm thấy ở dòng cà chua bố mẹ không đột biến.

Khi lai giữa dòng cà chua FLAVR SAVR™ với dòng cà chua anh đào ở Mỹ, tỷ lệ lai chéo giữa các dòng cà chua này là rất thấp và dòng cà chua anh đào không phổ biến ở vùng dành cho sản xuất cà chua với quy mô lớn. Có thể kết luận rằng khả năng biến đổi gen giữa các dòng cà chua là nhỏ và thậm chí sự lai chéo giữa các loài cà chua là rất khó khăn. Trong trường hợp có thể xảy ra sự lai xa giữa các hạt phấn của cây cà chua FLAVR SAVR™ với các cây khác tính trạng chín chậm của các cây cà chua hoang dại là không giảm và có thể hạt phấn sẽ không sống sót khi đem thụ tinh.

3.1.1.4. Một số dòng Bông (*Gossypium hirsutum* L) chuyển gen

♦ Dòng 19-51A

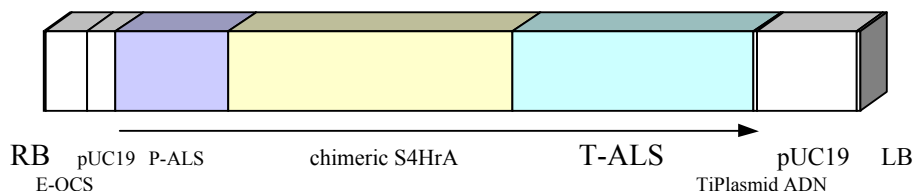
- Tính trạng: Kháng thuốc trừ cỏ Sulfonyleurea, đặc biệt là triasulfuron và metsulfuron - methyl.
- Phương pháp biến nạp: Chuyển gen gián tiếp vào cây thông qua *Agrobacterium tumefaciens*
- Mục đích sử dụng: sản phẩm bông cho sợi, hạt và bột để làm thức ăn gia súc, dầu từ hạt làm thức ăn cho con người.

Thông tin về công ty: Sản phẩm nông nghiệp của DuPont – Canada.

Quốc gia	Năm phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm và/hoặc thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Mỹ	1996	1996			

Dòng 19-51A đã được phát triển nhờ kỹ thuật tái tổ hợp ADN để đưa gen *ALS* chống chịu Sulfonyleurea, gen này mã hoá enzym *acetolactate synthase* (*ALS*). Enzym *ALS* đã sản sinh trong các dòng bông chuyển gen này giúp nó có khả năng chống chịu được thuốc trừ cỏ Sulfonyleurea. Gen *ALS* đã sử dụng trong dòng bông 19-51A là cấu trúc gen chimeric được kết hợp giữa hai gen *ALS* khác nhau mà cả hai gen này mã hoá các vùng nhạy cảm với thuốc trừ cỏ của *ALS* (Mazur và CS, 1987). Gen *chimeric*

S4- HrA được chuyển vào tế bào của cây bông nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Dòng bông đã sử dụng để phát triển dòng 19-51A là từ dòng Coker 312.



Hình 26: Cấu trúc pMH26 sử dụng trong biến nạp Dòng 19-51A

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
Gen <i>als</i> (acetolactate synthase) có nguồn gốc từ thể khảm của 2 gen AHAS (<i>S4-Hr4</i>)	Không có thông tin	Không có thông tin	PCR, Southern blot

♦ Dòng bông 281-24-236

- Tính trạng: Kháng sâu bọ thuộc bộ cánh vẩy
- Phương pháp biến nạp: Chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- Mục đích sử dụng: Sản phẩm bông cho sợi, hạt và bột để làm thức ăn gia súc, dầu từ hạt làm thức ăn cho con người.

Thông tin về công ty: Dow AgroSciences LLC

Quốc gia	Năm phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm hoặc thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Mexico			2004		
Mỹ	2004	2004			

Dow AgroSciences LLC đã phát triển dòng bông 281-24-236 (*Gossypium hirsutum*) thông qua sự biến đổi di truyền của dòng bông Acala GC510 (B690) để kháng sâu bọ thuộc bộ cánh vẩy. Dòng mới này tạo ra protein *CryIF* có nguồn gốc từ chủng *Bacillus thuringiensis*. Aizawai. Các *Delta-endotoxin* protein tạo ra gen *CryIF* hoạt động nhờ sự liên kết có chọn lọc với thụ quan đặc hiệu ở biểu mô ruột giữa của các loài sâu nhậy cảm. Khi ấu trùng của bộ cánh vẩy ăn phải *CryIF* thì bị

chết và hoạt tính đặc hiệu của nó có thể tham gia trực tiếp vào vị trí liên kết đặc hiệu ở các côn trùng đích. Không có vị trí liên kết đối với các *delta-endotoxin* của *B. thuringensis* trên bề mặt tế bào ruột của động vật có vú, vì vậy động vật nuôi và con người không nhạy cảm đối với các protein này.

3.1.1.5. Dòng Cải dầu Westar OXY-235 (*Brassica napus*) chuyển gen

- Tính trạng: Kháng thuốc trừ cỏ oxynil, bao gồm bromoxynil và ioxynil.
- Phương pháp biến nạp: chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium tumefaciens*.
- Mục đích sử dụng: Sản phẩm tiêu dùng cho con người và gia súc

Thông tin về công ty: Aventis CropScience (Rhone Poulenc Inc.)

Thông tin liên quan đến việc sử dụng sản phẩm chuyển gen này:

Quốc gia	Năm phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm và/ hoặc Thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Canada	2003		1997	1995	
Úc	1996	2002			
Nhật Bản	1997		1997	1997	
Mỹ	1998	1998			

Cải dầu (*Brassica napus*) được trồng thương phẩm ở 50 nước với tổng sản lượng đạt trên 40 triệu tấn. Các nước sản xuất Cải dầu chủ yếu vào năm 2000 là Trung Quốc, Canada, Ấn độ, Đức, Pháp, Úc và Mỹ. Cải dầu được trồng để lấy hạt, các hạt được dùng làm nguyên liệu chính trong dầu thực vật và cũng được sử dụng làm thức ăn gia súc. Thực phẩm chủ yếu sử dụng từ cải dầu ở Bắc Mỹ và Châu Âu là dầu ăn. Dầu cải dầu có thể được sử dụng để trộn xalát, để nấu nướng hay trộn lẫn với các loại dầu thực vật khác trong quá trình sản xuất bơ, dầu rán, salát, nấu nướng. Bột xay của cải dầu, một sản phẩm phụ của quá trình sản xuất dầu ăn được bổ sung theo những tỷ lệ nhất định vào trong thức ăn chăn nuôi.

Dòng cải dầu oxy-235 (ACS-BNØ11-5) được phát triển để cho phép sử dụng thuốc trừ cỏ oxynil, ioxynil và bromoxynil kiểm soát cỏ dại. Bromoxynil rất hiệu quả đối với loại cỏ có tán lá rộng, mà nó thường có ở vùng trồng Cải dầu và khi triển khai dòng cải dầu chuyển gen kháng bromoxynil sẽ cho phép kiểm soát cỏ dại mà không ảnh hưởng đến cây trồng. Oxy-235 chuyển gen chứa 1 bản sao của gen *bxn* được

tách từ vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* (sub. sp. *ozaenae*), gen này mã hoá enzym nitrilaza mà enzym này có khả năng thuỷ phân thuốc trừ cỏ oxynil thành các hợp chất không độc. Sự biểu hiện chính của gen *bxn* được điều khiển bởi *CaMV 35S* của virus khảm súp lơ (*CaMV*) và hàm lượng của enzym *nitrilaza* đã được xác định trong mô lá (1000ng/mg protein tổng số) và mô hạt (< 10 ng/ mg protein tổng số). Khi xác định dầu tinh chế thì không thấy có enzym *nitrilaza* (giới hạn xác định là 20 ppm).

Dòng cải dầu oxy-235 đã được thử nghiệm trên đồng ruộng ở Canada từ 1992 - 1996 để đánh giá các đặc tính nông học như sản lượng hạt, khả năng chịu lạnh, thời gian sinh trưởng, sự phá vỡ quả. Khi so sánh với các dòng Cải dầu thương phẩm không chuyển gen thì tất cả các thông số này đều bình thường. Sự thích nghi tính stress đã được đánh giá, bao gồm tính kháng chủ yếu với các bệnh do *B. napus*, ví dụ như bệnh nấm *Leptosphaeria maculans* (bệnh backleg) và tính nhạy cảm của oxy-235 ở trong vùng đã biểu hiện tốt hơn so với các dòng không chuyển gen. Sự khác nhau duy nhất giữa dòng cải dầu oxy-235 và dòng bố mẹ không chuyển nạp đó là dòng cải dầu oxy-235 biểu hiện tính kháng với ioxynil và bromoxynil.

Protein *nitrilase* không được tìm thấy trong dầu tinh chế từ cải dầu chuyển gen oxy-235, không gây dị ứng cho con người và gia súc. Cũng không làm thay đổi về mẫu sản phẩm hàng hoá.

Các nghiên cứu khác đã chứng minh được khả năng gây độc của protein *nitrilaza* trong cây cải dầu chuyển gen này. Những nghiên cứu này bao gồm nghiên cứu tính gây độc ở vòm miệng trên chuột, sự so sánh trình tự axit amin với các protein độc tố đã biết. Chưa có một nghiên cứu nào chứng minh khả năng gây độc của protein này đối với con người. Tương tự những nghiên cứu về sự phân huỷ (tính ổn định đối với sự phân huỷ pepsin) và giống như các chất gây dị ứng đã biết đã chứng minh rằng enzym *nitrilaza* bị phân huỷ nhanh (≤ 15 giây nhờ biểu hiện để tái tạo dịch vị) và không có tính tương đồng các chất gây dị ứng đã biết.

3.1.1.6. Dòng Rau diếp xoăn (*Chichorium intybus*) chuyển gen

Các dòng Radicchio Rosso RM3-3, RM3-4 và RM3-6:

- Tính trạng: Kháng thuốc trừ cỏ ammonium glufosinate và tính bất dục đực.
- Phương pháp biến nạp: Chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

- Mục đích sử dụng: Làm thực phẩm cho con người hoặc là ở dạng tươi hoặc chế biến.

Thông tin liên quan đến việc sử dụng sản phẩm chuyển gen này:

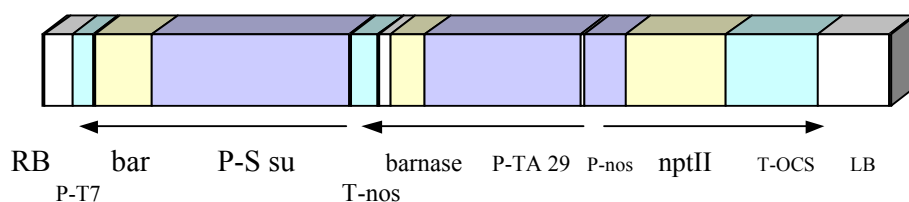
Quốc gia	Năm phóng thích ra ngoài môi trường	Thực phẩm và/ hoặc Thức ăn gia súc	Thực phẩm	Thức ăn gia súc	Thị trường
Mỹ	1997	1997			
Châu Âu	1996				1996

Để phát triển dòng rau diếp bất dục đực, enzym *ribonuclease* mã hoá bởi gen *barase* đã được đưa vào giống rau diếp này. Enzym này chỉ biểu hiện trong tế bào sắc tố của hạt phấn ở thời kỳ phát triển bao phấn và hạt phấn, do đó tạo ra cây bất dục đực. Để gen *barase* biểu hiện trực tiếp trong tế bào hạt phấn thì promoter đặc hiệu của hạt phấn là *pTA 29* (Seurinck & CS, 1990) đã được sử dụng để điều khiển gen mã hoá enzym *ribonuclease*.

Sự biểu hiện của *barase* trong tế bào hạt phấn là kết quả thoái hoá ARNs của vật chủ và ngăn chặn sự phát triển hạt phấn. Gen *barase* mã hoá cho protein ribonuclease ngoại bào của vi khuẩn đất *Bacillus amynoliquefaciens*. Vi khuẩn này cũng chứa protein nội bào gọi là *barstar* mà đặc biệt là nó ức chế *barase* nhờ sự tổ hợp với một hỗn hợp phức tạp (Hartely, 1989). Do đó, *barstar* được tạo ra trong nội bào bởi các sinh vật tương tự mà nó tiết ra *barase* (Hartely và Smeaton, 1973).

Gen thứ 2 (*bar*) đã chuyển vào bộ gen của các dòng Radicchio Rosso RM3-3, RM3-4 và RM3-6, gen này mã hoá cho enzym phosphinothricin-N-acetyltransferase (*PAT*), làm cho thành phần hoạt tính trong thuốc trừ cỏ glufosinate là phosphinothricin không hoạt động. Gen *bar* được tạo ra trong các dòng Radicchio Rosso RM3-3, RM3-4 và RM3-6 dưới sự điều khiển của trình tự promoter *PssuAra* (promoter được tách từ *Arabidopsis thaliana*) và trình tự polyadenyl hoá/ kết thúc của enzym nopaline synthase. Mặc dù các dòng Radicchio Rosso RM3-3, RM3-4 và RM3-6 kháng thuốc trừ cỏ nhưng các con lai đã phát triển từ các dòng này có thể hoặc không thể kháng thuốc trừ cỏ. Nếu mẹ không kháng thuốc trừ cỏ thì chỉ có một nửa số con lai sẽ mang gen kháng. Điều này có nghĩa là nông dân sẽ không thể dùng thuốc trừ cỏ bởi vì 50% cây sẽ chết. Tuy nhiên, nếu mẹ trong sơ đồ chọn lọc con lai

đã kháng glufosinate thì tất cả các thế hệ con lai sẽ kháng thuốc trừ cỏ và nông dân có thể dùng thuốc trừ cỏ (thuốc trừ cỏ được đăng kí bởi Tổ chức Bảo vệ Môi trường (EPA) để sử dụng trên rau diếp).



Hình 27: Cấu trúc plasmid *pTTM8RE* sử dụng trong biến nạp các dòng *RM3-3*, *RM3-4* và *RM3-6*

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen MS3:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Gen chỉ thị	Phương pháp xác định
<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ <i>S.hygroscopicus</i>; - Gen <i>barnase</i> (barnase ribonuclease) có nguồn gốc từ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn <i>PSsuAra</i> từ <i>Arabidopsis thaliana</i>; - Đoạn peptit chuyển tiếp của lục lạp có nguồn gốc từ <i>A. thaliana</i>; - Promoter đặc hiệu với bao phấn <i>pTa29</i> có nguồn gốc từ <i>Nicotiana tabacum</i> - Đoạn promoter <i>nos</i> (nopaline synthase) từ <i>A. tumefaciens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn terminator của gen TL-DNA số 7 có nguồn gốc từ <i>A. tumefaciens</i>; - Đoạn tín hiệu PolyA đầu 3' <i>nos</i> có nguồn gốc từ <i>A.tumefaciens</i> - Đoạn <i>T-OCS</i> (octopine synthase) 	<ul style="list-style-type: none"> Gen <i>nptII</i> (neomycin phosphotransferase II) có nguồn gốc từ <i>E. coli</i> 	PCR, Southern blot

3.1.1.7. Một số dòng Lúa (*Oryza sativa*) chuyển gen

◆ Dòng lúa *Oryza sativa japonica*

Dòng này được biến nạp với cấu trúc *pWNHG* mang các gen mã hoá cho neomycin phospho-transferase (*nptII*), hygromycin phosphotransferase (*Hygr*) và glucuronidase (*GUS*). 13 dòng lúa biến nạp được tạo ra và tỷ lệ các cây chuyển gen chứa các bản sao nguyên vẹn của các gen được chuyển, đặc biệt các gen không chọn

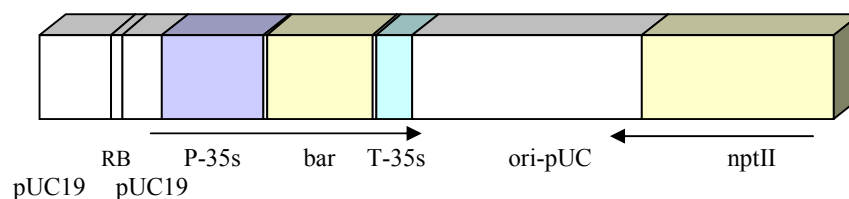
lọc có tỷ lệ cao hơn biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium*. Mức độ biểu hiện của gen *GUS* ở các cây chuyển gen thu được từ biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium* ổn định hơn các dòng chuyển gen thu nhận được bằng súng bắn gen. Hầu hết các cây chuyển gen thu nhận được từ hai hệ thống biến nạp các gen ngoại lai đều phân ly theo định luật Mendelian ở thế hệ T1, T2. Khả năng phát triển của các cây chuyển gen thu nhận được từ biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium* là tốt hơn. Biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium* là một hệ thống ưu việt để thu nhận các cây chuyển gen với số bản sao thấp hơn, các gen được chuyển không bị thay đổi và sự biểu hiện của các gen ổn định hơn, trong khi đó súng bắn gen là một hệ thống có hiệu quả cao để tạo ra số lượng lớn các cây chuyển gen với vùng biểu hiện gen rộng.

♦ Dòng lúa *Oryza sativa* L.

Có 3 gen tương đồng riêng biệt để tổng hợp glutamine (GS1). Có OsGS1;1, OsGS1;2, OsGS1;3, OsGS1;1, được biểu hiện trong tất cả các bộ phận được kiểm tra có sự biểu hiện cao ở các phiến lá, trong khi OsGS1;2, và OsGS1;3, được biểu hiện chính ở rễ và các bông non. Các đột biến nội sinh cho thấy tỷ lệ sinh trưởng chậm. Và lúa khi phát triển ở nồng độ nitrogen bình thường. mRNA dị thường cho GS1;1, được sao chép, protein *GS1* và hoạt tính của nó ở trong các phiến lá có thể được xác định. Nghèo glutamine trong rễ và các phiến lá của các đột biến thấp hơn các kiểu hoang dại. Việc đưa trở lại OsGS1;1, cADN dưới sự kiểm chứng của promoter của nó và các đột biến đã thành công hoàn toàn về kiểu hình. Những kết quả đã chứng minh rằng GS1;1 là quan trọng cho sự phát triển bình thường. GS1;2 và GS1;3 là không thể thay thế cho chức năng của GS1;1.

♦ Dòng ACS-OSØØ1-4, ACS-OSØØ2-5 (LLRICE06, LLRICE62)

- Tính trạng: kháng thuốc trừ cỏ phosphinothricin, đặc biệt ammonium glufosinate
- Phương pháp chuyển gen: chuyển trực tiếp ADN



Hình 28: Cấu trúc Plasmid pB5/35Sbar được sử dụng để tạo dòng LLRICE06 và LLRICE62

- Các yếu tố di truyền đã được biến nạp vào dòng chuyển gen:

Gen chuyển	Promoter	Terminator	Phương pháp xác định
Gen <i>bar</i> có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>S.hygroscopicus</i>	- Đoạn <i>CaMV</i> -35S	Đoạn tín hiệu polyA của <i>CaMV</i>	PCR, Southern blot, ELISA

- Dòng lúa LLRICE06 và LLRICE62 dùng kỹ thuật ADN tái tổ hợp cho phép sử dụng ammonium glufosinate, thành phần hoạt tính trong chất diệt cỏ Basta, Finale, Buster, Harvest và Liberty. Hiện nay những người trồng lúa ở Mỹ kiểm soát cỏ dại thông qua việc kết hợp các chất diệt cỏ, trồng luân canh và trồng bình thường ở vùng canh tác và vùng ngập úng. Gen *bar* là gen mã hoá enzyme phosphinothricin N-acetyltransferase (*PAT*), được phân lập từ chủng *Streptomyces hygroscopicus* HP632 và trình tự gen được đưa trực tiếp vào hệ gen cây chủ.

Ngoài việc cung cấp tính trạng kháng thuốc trừ cỏ, gen mã hoá enzym *PAT* còn được sử dụng như marker chọn lọc để xác định các cây đã chuyển gen trong suốt quá trình tái sinh nuôi cấy mô. Glufosinate là tên viết tắt của muối ammonium (glufosinate ammonium). Nó là chất diệt cỏ có phổ rộng và được sử dụng để kiểm soát vùng cỏ dại rộng lớn trong quá trình canh tác. Glufosinate là hợp chất tự nhiên được phân lập từ 2 loài nấm *Streptomyces*, ức chế hoạt tính của enzym tổng hợp glutamin, enzym cần thiết cho sự tạo thành glutamin và độc tính ammonia. Việc sử dụng glufosinate dẫn đến làm giảm hàm lượng glutamin và làm tăng ammonia trong mô thực vật. Điều này làm cho quá trình quang hợp ngừng và cây chết sau vài ngày.

Các đặc tính biến đổi: Các phân tích southern blot của ADN từ những dòng lúa chuyển gen đã biểu hiện sự tích hợp của một bản sao đơn của cassette gen *bar* vào hệ gen lúa LLRICE62 và một bản sao đầy đủ của cassette gen *bar* vào hệ gen LLRICE06.

Sự ổn định di truyền của các tính trạng được đưa vào: tính trạng kháng chất diệt cỏ từ các dòng LLRICE06 và LLRICE62 đã tạo ra các dòng lúa kháng chất diệt cỏ thương mại khác nhờ phương pháp lai truyền thống. Các phân tích Southern blot hệ gen của các thế hệ T2, T3, T4 của dòng LLRICE06 và từ các thế hệ T2, T3 của LLRICE62, đã tạo ra các con lai giống hệt nhau và xác định sự ổn định di truyền của các dòng biến nạp ban đầu.

Bảng 4: Một số gen hữu dụng trong nghiên cứu chuyển nạp gen ở lúa

Đặc tính cải thiện	GEN HỮU DỤNG/ NGUỒN GỐC	Đối tượng	Tác giả	Quốc gia
I. Kháng sâu (48)				
- Các loại sâu đục thân, cắn lá (31)	- <i>CryIA(b)</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	- Sâu đục thân	- Fujimoto & CS., 1993; Wunn & CS., 1996; Chen & CS., 1998; Datta & CS., 1999; Shu & CS., 2000; Ye & CS., 2001; Wu & CS., 2002a; Wu & CS., 2002b; Ramesh & CS., 2004	- Nhật Bản, Thụy sỹ, Philippin, Trung Quốc (4), Canada, Ấn Độ
	- <i>CryIA(c)</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	- Sâu đục thân	- Nayak & CS., 1997; Chen & CS., 1998; Maqbool & CS., 2001; Khanna và Raina, 2002; Loc & CS., 2002; Ramesh & CS., 2004	- Ấn Độ (3), Anh (2), Canada
	- Dung hợp <i>CryIA(b)</i> và <i>CryIA(c)</i>	- Sâu đục thân	- Tu & CS., 2000, Ramesh & CS., 2004, Nguyễn Hữu Hổ & CS, 2006	- Philipines, Ấn Độ, Việt Nam
	- Dung hợp <i>CryIA(b)</i> - <i>CryIB</i>	- Sâu đục thân		- Việt Nam
	- <i>Cry2A</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	- Sâu đục thân và cắn lá	- Nguyễn Hữu Hổ & CS, 2001	- Anh (2), Trung Quốc
	- <i>CryIB</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	- Sâu đục thân	- Maqbool & CS., 1998 và 2001; Chen & CS., 2005	- Pháp
	- <i>CryIII A</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	- Sâu đục thân	- Cotfastis & CS., 2002	- Mỹ (2), Tây Ban Nha
	- Gen <i>Proteinase inhibitor</i> từ khoai tây (<i>pin2</i>) và ngô (<i>mpi</i>)	- Sâu đục thân	- Kumpatla & CS., 1997; Kumpatla và Hall, 1998; Vila & CS., 2005	- Mỹ
	- Gen <i>Trypsin inhibitor</i> (<i>wti-B</i>) từ đậu rồng (<i>winged bean</i>)	- Sâu đục thân	- Duan & CS., 1996,	- Nhật Bản
	- Gen <i>Insect toxin</i> (<i>spI</i>) từ nhện	- Sâu cuốn lá và đục thân	- Mochizuki & CS., 1999	- Trung Quốc
	- Cystatin từ ngô	- Các loại sâu	- Qiu & CS., 2001	- Nhật Bản

	- Virus enhancing factor (<i>ef</i>) từ entomopoxviruses	- Các loại côn trùng	- Irie & CS., 1996 - Hukuhara & CS., 1999	- Nhật Bản
Các loại rầy (12)	- <i>gna</i> (agglutinin gene) từ <i>Galanthus nivalis</i> - Gen Agglutinin từ lá của <i>Allium sativum</i>		- Upadhyay & CS., ?; Rao & CS., 1998; Sundhaka & CS., 1998; Tang & CS., 1999; Foissac & CS., 2000; Tinjuanojun & CS., 2000; Maqbool & CS., 2001; Loc & CS., 2002; Ma & CS., 2003; Nagadhara & CS., 2004; Ramesh & CS., 2004 - Saha & CS., 2006	- Úc, Ấn Độ (2), Anh (5), Trung Quốc (2), Mỹ - Ấn Độ
- Côn trùng trong bảo quản sau thu hoạch (2)	- Gen Trypsin inhibitor BTI-CMe (<i>Itr1</i>) từ lúa mạch - Gen Avidin từ gà	- Các loại côn trùng trong bảo quản hạt - Các loại côn trùng trong bảo quản hạt	- Julio & CS., 2003 - Yoza & CS., 2005	- Tây ban nha - Nhật Bản
Kháng rầy và đục thân (2)	- Gen <i>gna</i> và trypsin inhibitor (<i>sbt1</i>) từ đậu tương - <i>gna</i> và <i>CryIA(c)</i>		- Li & CS., 2005 - Loc & CS., 2001	- Trung Quốc - Việt Nam
Kháng sâu và bệnh (1)	- <i>Xa21</i> , <i>RC7 chitinase</i> và <i>Bt</i>	- Sâu đục thân và bệnh cháy lá và cháy mép lá	- Datta & CS., 2002	- Philippin
II. Kháng bệnh (55)				
- Bệnh nấm (28)	- Gen Anthocyanin (<i>c1</i> , <i>r</i> , <i>c2</i>) từ ngô - Antifungal gen (<i>afp</i>) từ <i>Aspergillus giganteus</i> - Gen Beta-glucanase (<i>gns1</i>) từ lúa - Gen Chitinase (<i>cht2</i> , <i>cht3</i>) từ lúa - Gen Chitinase (<i>chiC</i>) từ	- Cháy lá - Cháy lá - Cháy lá - Cháy lá - Cháy lá	- Gandikota & CS., 2001 - Coca & CS., 2004; Moreno & CS., 2005 - Nishizawa & CS., 2003 - Nishizawa & CS., 1999 - Iton & CS., 2003	- Ấn Độ - Tây Ban Nha (2) - Nhật Bản, - Nhật Bản - Nhật Bản

<p><i>Streptomyces griseus</i> HUT6037</p> <p>- Gen <i>Chitinase</i> từ <i>Phaseolus limensis</i> và gen β-1,3-glucanase từ <i>Nicotiana tabacum</i></p> <p>- Gen <i>Cecropin A</i> từ <i>Hyalophore cecropia</i></p> <p>- Gen <i>RBB12-3</i></p> <p>- Gen <i>Defensin</i> từ cây <i>Wasabia japonica</i></p> <p>- Gen <i>Stilbene synthase</i> từ nho</p> <p>- Gen <i>HC-toxin reductase-like</i> (<i>yk1</i>) từ lúa</p> <p>- Gen <i>Mitogen-activated</i> protein kinase (<i>OsMAPK5</i>) từ lúa</p> <p>- Gen <i>Mitogen-activated</i> protein kinase 1 (<i>MK1</i>) từ <i>Capsicum annuum</i></p> <p>- Gen kháng bệnh <i>rir1B</i> từ lúa</p> <p>- Gen <i>Puroindoline</i> (<i>pinA</i> và <i>pinB</i>) từ lúa mì</p> <p>- <i>Chitinase</i> từ lúa, <i>glucanase</i> từ cỏ linh lăng và ribosome-inactivating protein (<i>B-RIP</i>) từ lúa mạch</p> <p>- Selenium binding protein (<i>OsSBP</i>) từ lúa</p> <p>- Các enzym làm thoái hoá thành tế bào (<i>CWDEs</i>), <i>ech42</i>, <i>nag70</i> và <i>gluc78</i> từ <i>Trichoderma atroviride</i></p> <p>- Gen kháng Trichothecene</p>	<p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá</p> <p>- Cháy lá và cháy mép lá</p> <p>- Cháy lá và cháy mép lá</p> <p>- Cháy lá và cháy mép lá</p> <p>- Cháy lá và đốt vằn</p> <p>- Bệnh do nấm <i>Fusarium</i></p>	<p>- Xu & CS., 2003</p> <p>- Coca & CS., 2005 và 2006</p> <p>- Qu & CS., 2003</p> <p>- Kanzaki & CS., 2002</p> <p>- Stark-Lorenzen & CS., 1997</p> <p>- Uchimiya & CS., 2002; Hayashi & CS., 2005</p> <p>- Xiong và Yang, 2003</p> <p>- Lee & CS., 2004</p> <p>- Schaffrath & CS., 2000</p> <p>- Krishnamurthy & CS., 2001</p> <p>- Feng và Li, 1999</p> <p>- Sawada & CS., 2004</p> <p>- Mei & CS., 2004</p> <p>- Higa & CS., 2003</p>	<p>- Trung Quốc</p> <p>- Tây ban nha (2)</p> <p>- Trung Quốc</p> <p>- Nhật Bản</p> <p>- Đức</p> <p>- Nhật Bản (2)</p> <p>- Mỹ</p> <p>- Hàn Quốc</p> <p>- Thụy Sĩ</p> <p>- Mỹ</p> <p>- Trung Quốc</p> <p>- Nhật Bản</p> <p>- Trung Quốc</p> <p>- Nhật Bản</p>
---	--	---	--

	(<i>tri101</i>) và gen khử độc zearalenone (<i>zdh101</i>) - Gen Bax inhibitor 1 (<i>AtBI 1</i>) từ <i>Arabidopsis</i>	- Nghiên cứu vai trò của Bax inhibitor protein trong việc ức chế quá trình chết của tế bào sau khi được xử lý bằng chiết suất của nấm gây bệnh cháy lá <i>M. grisea</i>	- Matsumura & CS., 2003	- Nhật Bản
	- Gen <i>Chitinase</i> (<i>PR</i>) - Gen <i>Chitinase</i> (<i>chil1</i>) từ lúa - Gen <i>Chitinase</i> (<i>PR-3</i>) từ lúa - Ribosome-inactivating protein (<i>mod1</i>) từ ngô và <i>chitinase</i> (<i>rch10</i>) từ lúa - Gen <i>Thaumatococcus-like protein</i> (<i>tlp</i>) từ lúa	- Khô vằn - Khô vằn - Khô vằn - Khô vằn - Khô vằn	- Baisakh & CS., 1999; - Datta & CS., 2000 - Datta & CS., 2001 - Kim & CS., 2003 - Datta & CS., 1999	- Philippin - Philippin - Philippin - Hàn Quốc - Philippin
- Bệnh vi khuẩn (12)	- <i>Xa21</i> từ loài lúa hoang <i>Oryza longistaminata</i> - <i>Xa26</i> từ lúa - Nhân tố sao chép <i>rTGA2.1</i> đã được biến đổi từ lúa - Gen <i>Cecropin B</i> từ <i>Bombyx mori</i> - Ferredoxin-like protein (<i>apl1</i>) từ ớt ngọt - Gen <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (<i>OsMAPK5</i>) từ lúa	- Cháy mép lá - Cháy mép lá - Cháy mép lá - Cháy mép lá - Cháy mép lá - Bệnh do vi khuẩn <i>Burkholderia glumea</i>	- Tu & CS.,1998; Zhang & CS.,1998; Tang & CS.,1999; Baisakh & CS.,2000; Zhai & CS.,2001 và 2004 - Sun & CS., 2004 - Fitzgerald & CS., 2005 - Wang & CS., 1998; Sharma & CS., 2000 - Tang & CS., 2001 - Xiong và Yang, 2003	- Philippin (2), Trung Quốc (3), Mỹ - Trung Quốc - Mỹ - Trung Quốc, Nhật Bản - Trung Quốc - Mỹ

- Tăng sức đề kháng bệnh (5)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Glucose oxidase (gox)</i> từ <i>Aspergillus niger</i> - Gen <i>N-(hydroxycinnamoyl) transfrase (tht)</i> từ cây ớt - Gen <i>5-epi-aristolochene</i> - Gen <i>Ribosome-inactivating protein b-23 (Zm-crip3a)</i> - Gen <i>Salicylate hydroxylase (nahG)</i> từ <i>Pseudomonas putida</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Kháng các bệnh do nấm và vi khuẩn - Tăng sức đề kháng của cây trồng đối với tác nhân gây bệnh - Tăng khả năng kháng bệnh của cây - Tăng khả năng kháng bệnh của cây - Tạo dòng lúa không có salicylic acid dùng nghiên cứu tính kháng bệnh của cây trồng 	<ul style="list-style-type: none"> - Kachroo & CS., 2003 - Jang & CS., 2004 - Lee & CS., 2001 - Kim & CS., 1999 - Yang & CS., 2004 	<ul style="list-style-type: none"> - Ấn Độ - Hàn Quốc - Hàn Quốc - Hàn Quốc - Mỹ
- Bệnh virus do côn trùng chích hút (9)	<ul style="list-style-type: none"> - Đoạn gen tạo ribosome có đầu hình búa, khiến cho mARN của virus làm lùn cây ở lúa (<i>RDV</i>) - Đoạn gen số 8 của <i>RDV</i> - Nucleocapsid protein của virus <i>Hoja Blanca</i> ở lúa (<i>RHBV</i>) - Gen Coat protein (<i>cp1</i>, <i>cp2</i> và <i>cp3</i>) của <i>RTSV</i>. - Đoạn gen số 9 của <i>RRSV</i> - Gen số 7 và 10 (sense và antisense) và 8,9, và 10 của <i>RRSV</i> - Gen <i>Kunitz trypsin inhibitor (skti)</i> - RNA-dependent RNA polymerase gen từ virus gây bệnh đốm vàng ở lúa (<i>RYMV</i>) - Gen <i>bZIP</i> protein <i>RF2b</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Bệnh lùn xoắn lá - Bệnh lùn xoắn lá - Bệnh virus do RHBV - Bệnh virus do rầy xanh - Bệnh virus do rầy nâu - Bệnh virus do rầy nâu - Bệnh virus do rầy nâu - Bệnh do RYMV - Nghiên cứu cơ chế 	<ul style="list-style-type: none"> - Han & CS., 2000 - Zheng & CS., 1998 - Lentini & CS., 2003 - Siwamani & CS., 1999 - Chaogang & CS., 2003 - Lee & CS., 1999 - Pinto & CS., 1999 - Dai & CS., 2004 - Zheng & CS., 2000 	<ul style="list-style-type: none"> - Trung Quốc - Columbia - Mỹ - Trung Quốc - Trung Quốc - Hàn Quốc - Anh - Trung Quốc - Trung Quốc

		gây bệnh lùn xoắn lá (rice tungro virus)		
Bệnh trên hạt (1)	- Gen <i>Thionin</i> từ lúa yến mạch	- Các loại bệnh nấm trên hạt như <i>Burkholderia plantarii</i> và <i>B. glumae</i>	- Iwai & CS., 2002	- Nhật Bản
III. Kháng điều kiện bất lợi và cải thiện môi trường (54)				
- Kháng mặn (19)	<ul style="list-style-type: none"> - Aquaporin (<i>HvPIP2;1</i>) - Gen <i>Arginine decarboxylase</i> (<i>adc</i>) - Gen <i>Calcium-dependent protein kinase</i> (<i>OsCDPK7</i>) - Gen <i>Calcineurin A</i> - Gen <i>glutamine synthase</i> của lục lạp (<i>GS2</i>) - Gen <i>Cholin oxidase</i> (<i>codA</i>) - Gen <i>Delta 1-pyroline-5 carbo-xylate synthase</i> (<i>p5cs</i>) - Gen <i>hva1</i> - Gen Na⁺/H⁺ antiporter (<i>nhaA</i>) - Gen Vacuolar-type Na⁺/H⁺ antiporter (<i>AgNHX1</i>) - Na⁺/H⁺ antiporter gene từ <i>S. salsa</i> (<i>SsNHX1</i>) - Gen <i>Trehalose-6-phosphate synthase</i> (<i>OtsA</i>) và <i>trehalose-6-phosphate phosphatase</i> (<i>OtsB</i>) 		<ul style="list-style-type: none"> - Katsuhara & CS., 2003, Hanba & CS. , 2004 - Roy và Wu , 2001; Capell & CS., 2004 - Saijo & CS., 2000 - Ma & CS., 2005 - Hoshida & CS., 2000 - Sakamoto & CS., 1998; Mohanty & CS., 2002; Su & CS., 2006 - Zhu & CS. , 1998, Su và Wu, 2004 - Xu & CS., 1996 - Wu & CS., 2005 - Ohta & CS., 2003 - Zhao & CS., 2006 - Garg & CS., 2002 - Roy và Wu, 2002 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản (2) - Ấn Độ, Đức - Nhật Bản - Trung Quốc - Nhật Bản - Nhật Bản, Ấn Độ, Mỹ - Mỹ (2) - Mỹ - Trung Quốc - Nhật Bản - Trung Quốc - Hàn Quốc - Ấn Độ

	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>S-adenosylmethionine decarboxylase (samdc)</i> - Gen <i>Superoxide dismutase (Mn-SOD)</i> 		- Tanaka & CS., 1999	- Nhật Bản
- Kháng hạn (9)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>cor47</i> - Gen <i>Delta 1-pyrroline-5 carboxylate synthase (p5cs)</i> - Gen <i>hva1</i> - Protein làm tăng sự phát sinh phôi (<i>PMA80</i> và <i>PMA11959</i>) - Gen Na⁺/H⁺ antiporter (<i>nhaA</i>) - Gen Na⁺/H⁺ antiporter <i>SOD2</i> - Gen <i>Trehalose-6-phosphate synthase (OtsA)</i> và <i>trehalose-6-phosphate phosphatase (OtsB)</i> - Manganese superoxide dismutase (MnSOD) 		<ul style="list-style-type: none"> - Cheng và Wu, 1998 - Su và Wu, 2004 - Xu & CS., 1996; Rohila & CS., 2002 - Cheng & CS., 2002 - Wu & CS., 2005 - Zhao & CS., 2005 - Garg & CS., 2002 - Wang & CS., 2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Mỹ - Mỹ - Mỹ (2) - Mỹ - Trung Quốc - Trung Quốc - Hàn Quốc - Trung Quốc
- Kháng lạnh (5)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Calcium-dependent protein kinase (OsCDPK7)</i> - Gen <i>Catalase (cat)</i> - Gen <i>Cholin oxidase (codA)</i> - Gen <i>Zeta glutathione S-transferase (#-GST)</i> - Nhân tố sao chép có thể gây lạnh <i>CBF1/DREB1b</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Saijo & CS., 2000 - Matsumura & CS., 2002 - Sakamoto & CS., 1998 - Takesawa & CS. , 2002 - Lee & CS., 2004 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Nhật Bản - Nhật Bản - Hàn Quốc
- Kháng nhiệt độ cao (2)	<ul style="list-style-type: none"> - Protein gây sốc nhiệt (<i>sHSH17.7</i>) - <i>hsp101 (Athsp101)</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Murakami & CS., 2004 - Surekha & CS., 2003 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Ấn Độ
- Kháng tất cả điều kiện bất	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>ykl</i> - Gen <i>Arginine decarboxylase</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Uchimiya & CS., 2002 - Capell & CS., 1998; Bassie & CS, 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Anh (5)

lợi như mặn, hạn, lạnh và nhiệt độ cao (14)	<p>(<i>adc</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Ornithine decarboxylase</i> (<i>odc</i>) - Gen <i>S-adenosylmethionine decarboxylase</i> (<i>samdc</i>) - Betain aldehyde dehydrogenase (<i>badh</i>) - Gen <i>hva1</i> - Gen <i>Trehalose-6-phosphate synthase</i> (<i>OtsA</i>) và <i>trehalose-6-phosphate phosphatase</i> (<i>OtsB</i>) - Gen <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (<i>OsMAPK5</i>) - <i>OsDREB1</i> - <i>CBF3/DREB1A</i> và <i>ABF3</i> từ <i>Arabidopsis</i> 		<p>2000; Capell & CS, 2000; Noury & CS., 2000, Nghia & CS., 2003</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lepri & CS., 2001 - Hang & CS., 2002 - Kishitani & CS., 2000 - Rohila & CS., 2002 - Jang & CS., 2003 - Xiong và Yang, 2003 - Ito & CS., 2006 - Oh & CS., 2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Anh - Anh - Nhật Bản - Mỹ - Hàn Quốc - Mỹ - Nhật Bản - Nhật Bản
- Kháng ngập úng (1)	- Gen <i>l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid synthase</i> (<i>OsACS5</i>)		- Zhou & CS., 2002	- Bỉ
- Cải thiện ô nhiễm môi trường (4)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Mercuric reductase</i> (<i>merA</i>) từ vi khuẩn - Gen <i>Cytochrome P450</i> (<i>CYP2B6</i>) của người - Gen <i>Cytochrome P450</i> (<i>CYP1A1</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Hấp thu và chuyển hoá thuỷ ngân sang dạng có độc tính thấp - Tạo giống lúa có khả năng phân huỷ thuốc trừ cỏ gốc metolachlor - Tạo giống lúa có khả năng phân huỷ thuốc trừ cỏ gốc atrazine và simazine 	<ul style="list-style-type: none"> - Heaton & CS., 2003 - Kawahigashi & CS., 2005 - Kawahigashi & CS., 2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Mỹ - Nhật Bản - Nhật Bản

	- Gen <i>Cytochrome P540</i> (<i>CYP1A1</i> , <i>CYP2B6</i> , <i>CYP2C9</i> và <i>CYP2C19</i>)	- Tạo giống lúa có khả năng phân huỷ và kháng thuốc trừ cỏ	- Inui và Ohkawa, 2005	- Nhật Bản
IV. Cải thiện về hình thái, khả năng hấp thu dinh dưỡng và quang hợp của cây (45)				
- Cải thiện về hình thái và năng suất (25)	<ul style="list-style-type: none"> - Antisense của gen <i>OsGI</i> - Gen điều khiển hoa giống lá - <i>RCN1</i> và <i>RCN2</i> - Gen cấu thành nên rế ở lúa (<i>OsRAA1</i>) - Gen <i>GA2-oxidase</i> (<i>OsGA2ox1</i>) - Các gen <i>MADS-box</i> : <i>OsMADS1</i>, <i>OsMADS2</i>, <i>OsMADS5</i>, <i>OsMADS6</i>, <i>OsMADS7</i>, <i>OsMADS8</i>, <i>OsMADS14</i>, <i>OsMADS16</i> - Các gen <i>Homeo Box</i> : <i>OSH1</i>, <i>OSH6</i>, <i>OSH15</i>, <i>OSH43</i> và <i>OSH71</i> - Gen <i>Phytochrome A</i> (<i>phyA</i>) - Gen <i>Sucrose-phosphate synthase</i> (<i>sps</i>) - Gen <i>Teosinte</i> nhánh 1 - Antisense của gen <i>OsPPRI</i> (pentatricopeptide repeat) 	<ul style="list-style-type: none"> - Rút ngắn thời gian sinh trưởng - Rút ngắn thời gian sinh trưởng - Nghiên cứu chức năng của <i>RCN1</i> và <i>RCN2</i> trong quá trình phát triển của bông lúa - Nghiên cứu chức năng của <i>OsRAA1</i> trong sự phát triển của rế - Làm giảm chiều cao cây - Cải thiện cao cây, thời gian sinh trưởng và hình thái - Nghiên cứu sự thể hiện và chức năng của gen <i>homeobox</i> (<i>OSH</i>) trong quá trình phát triển của cây - Cải thiện về dạng hình và năng suất - Tăng năng suất - Phát triển của chồi thứ cấp trên thân - Nghiên cứu sự phát triển của lục lạp 	<ul style="list-style-type: none"> - Hayama & CS., 2003 - He & CS., 2000 - Nakagawa & CS., 2002 - Ge & CS., 2004 - Sakamoto & CS., 2001 và 2003 - Jeon & CS., 2000a và 2000b; Prasad & CS., 2001; Lee & CS., 2003 - Sentoku & CS., 2000 - Clough & CS., 1995; Kong & CS., 2003; Garg & CS., 2005 - Takahashi & CS., 2000; Lunn & CS., 2003 - Takeda & CS., 2003 - Gothandam & CS., 2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Mỹ - Nhật Bản - Trung Quốc - Nhật Bản (2) - Hàn Quốc (3), Ấn Độ - Nhật Bản - Hàn Quốc, Mỹ (2) - Nhật Bản, Úc - Nhật Bản - Nhật Bản

	protein) - Gen <i>Cytochrome c</i> - Gen <i>Expansin</i> (<i>OsEXP4</i>): sense và antisense - Antisense ADN của một cấu trúc siêu phân tử – heterotrimeric G protein từ lúa - Gen <i>GAI</i> từ <i>Arabidopsis</i> - Gen Antisense nucleoside diphosphate (<i>NDP</i>) kinase - Gen <i>Calcium-dependent protein kinase</i> (<i>OsCDPK2</i>) - Sense và antisense của gen <i>phytosulfokine-α</i> (<i>OsPSK</i>) từ lúa	- Nghiên cứu chức năng của cytochrome c - Nghiên cứu vai trò của expansin trong sinh trưởng và phát triển của cây - Nghiên cứu chức năng của heterotrimeric G protein - Nghiên cứu chức năng của <i>GAI</i> gene trong quá trình sinh tổng hợp gibberellin - Nghiên cứu chức năng của gen <i>NDP</i> (nucleoside diphosphate kinase) trong quá trình phát triển của cây - Nghiên cứu sự thể hiện và chức năng của gen <i>CDPK</i> (Calcium-dependent protein kinase) trong quá trình phát triển của cây - Nghiên cứu chức năng và sự thể hiện của <i>phytosulfokine-α</i>	- Jang & CS., 2002 - Choi & CS., 2003 - Fujisawa & CS., 1999 - Fu & CS., 2001 - Pan & CS., 2000 - Morello & CS., 2000 - Yang & CS., 1999	- Hàn Quốc - Mỹ - Nhật Bản - Anh - Nhật Bản - Italia - Nhật Bản
- Khả năng quang hợp (9)	- Aquaporin (<i>HvPIP2;1</i>) - Gen <i>Phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (<i>pepc</i>) - <i>NADP</i> -dependent malic enzyme (<i>NADP-ME</i>) từ ngô - Gen <i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (<i>PCK</i>) từ cây C4	- Cải thiện quang hợp của cây - Cải thiện quang hợp của cây - Cải thiện quang hợp của cây - Cải thiện quang hợp của cây	- Hanba & CS., 2004 - Ku & CS.,1999; Agaric & CS.,2002; Fukayama & CS.,2003 - Takeuchi & CS.,2000 - Suzuki & CS.,2000	- Nhật Bản - Mỹ, Nhật Bản (2) - Nhật Bản - Nhật Bản

	<p><i>Urochloa panicoides</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>C4-Specific Pyruvate, Orthophosphate Dikinase (C4-Pdk)</i> từ ngô - <i>NADP-malic enzyme (ME)</i> từ lúa và gen <i>phosphoenol-pyruvate carboxylase (PC), pyruvate, orthophosphate dikinase (PK)</i>, và <i>PC+PK (CK)</i> từ ngô - Antisense của <i>Rubisco activase (RCA)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cải thiện quang hợp của cây - Cải thiện quang hợp của cây - Nghiên cứu ảnh hưởng của việc giảm hoạt tính Rubisco activase lên Rubisco và quang hợp 	<ul style="list-style-type: none"> - Fukayama & CS.,2001 - Jiao & CS.,2002 - Jin & CS.,2004 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Trung Quốc - Trung Quốc
<ul style="list-style-type: none"> - Cải thiện khả năng hấp thu dinh dưỡng và cố định đạm (11) 	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Glutamine synthetase (GS1 và GS2)</i> từ vi khuẩn - Gen gây ra sự thiếu Fe (<i>Ids3</i>) - Gen <i>Nicotianamine aminotransferase (naatA và naatB)</i> - Nhân tố sao chép (<i>OsPTF1</i>) từ lúa - Promoter của gen vận chuyển phosphate, điều khiển gen chỉ thị <i>gus</i> hoặc <i>gfp</i> - Gen <i>Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (s6pdh)</i> - Gen <i>Antisense của Rubisco small subunit (rbcS)</i> - Gen <i>Lectin (psl)</i> và lectin-nucleotide phosphohydrolase 	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng khả năng hấp thu và sử dụng hiệu quả đạm - Tăng khả năng hấp thụ sắt - Tăng khả năng hấp thụ sắt - Cải thiện tính hấp thu phosphate trong môi trường nghèo lân - Cải thiện khả năng hấp thụ lân - Tăng khả năng di động của Bo trong mạch libe (phloem) - Cải thiện năng suất và hiệu quả sử dụng đạm trong điều kiện nồng độ CO₂ trong môi trường cao - Tạo khả năng cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm trên lúa 	<ul style="list-style-type: none"> - Sun & CS.,2005 - Kobayashi & CS., 2001 - Takahashi & CS., 2001 - Yi & CS.,2005 - Schunmann & CS., 2004 - Bellaloui & CS., 2003 - Makino & CS., 2000 - Sreevidya & CS., 2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Trung Quốc - Nhật Bản - Nhật Bản - Trung Quốc - Úc - Mỹ - Nhật Bản - Philippin

	(gs52) - Gen <i>Lipid transporter (ltp1)</i> - Gen chứa protein gắn kết với nhân tố <i>Nod</i> - Gen <i>Nodulin (Enod40)</i>	- Khả năng hình thành <i>mycorrhiza</i> của cây bụi trong vùng rễ - Tạo khả năng cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm - Tạo khả năng cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm	- Blilou & CS., 2000 - Dey & CS., 1999 - Dey & CS., 2004	- Tây ban nha - Philippin - Philippin
V. Cải thiện giá trị dinh dưỡng và phẩm chất hạt (41)				
- Cải thiện về trọng lượng hạt (1)	- Gen <i>glgC-TM</i>	- Tăng trọng lượng hạt	- Sakulsingharoj & CS., 2004	- Mỹ
- Cải thiện về protein (10)	- Gen 2S albumin (<i>s2sa</i>) - Gen Seed albumin (<i>SSA</i>) - Albumin từ cây hướng dương - Gen <i>Glycinin (AlaB1b)</i> - β -phaseolin từ <i>Phaseolus vulgaris</i> L - Gen <i>dhps</i> (Lysine-feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase) - Gen <i>Arginine decarboxylase</i> - Gen <i>Anthranilate synthase</i> đã bị biến đổi (<i>OASAI-D323N</i>) - Gen mã hoá cho tRNA (<i>lys</i>) đã bị biến đổi	- Tăng hàm lượng methionine và cysteine - Tăng amino acid giàu lưu huỳnh - Cải thiện hàm lượng lưu huỳnh trong hạt gạo - Tăng amino acid giàu lưu huỳnh - Tạo giống lúa giàu lysine (β -phaseolin) - Tăng hàm lượng lysine - Tăng hàm lượng polyamine - Tăng hàm lượng tryptophan - Tăng hàm lượng lysine	- Lee & CS., 2003 - Hagan & CS., 2003 - Islam & CS. ,2005 - Katsube & CS., 1999; Momma & CS.,1999 - Zheng & CS.,1995 - Lee & CS., 2001 - Capell & CS., 1999 - Tozawa & CS., 2001 - Wu & CS., 2003	- Đài Loan - Úc - Úc - Nhật Bản (2) - Mỹ - Hàn Quốc - Anh - Nhật Bản - Mỹ

- Cải thiện về tinh bột (7)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Amylopullulanase (apu)</i> - Antisense (756 bp) của gen <i>Wx</i> giữa exon 6 và 9 - Gen <i>Antisense</i> của glutelin A - Enzyme phân cắt tinh bột (<i>BEIIb</i>) - Gen phân cắt Glycogen (<i>glgB</i>) - Gen <i>Puroindoline (pinA và pinB)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Giảm hàm lượng amylose - Giảm hàm lượng amylose - Giảm hàm lượng glutelin - Cải thiện chất lượng tinh bột - Tăng mức độ phân nhánh của amylopectin trong tinh bột - Tăng độ mềm của hạt 	<ul style="list-style-type: none"> - Chaing & CS., 2005 - Terada & CS.,200; Lui & CS., 2002 - Maruta & CS., 2001 - Tanaka & CS. , 2004 - Kim & CS., 2005 - Krishnamurthy và Giroux, 2001 	<ul style="list-style-type: none"> - Đài Loan - Nhật Bản, Trung Quốc - Nhật Bản - Nhật Bản - Hàn Quốc - Mỹ
- Gia tăng hàm lượng sắt dễ tiêu (9)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Feritin</i> - Gen <i>Lactoferrin (rHLf)</i> - Siêu phân tử cDNA số 1 của Feritin ở đậu tương (<i>SoyferH-1</i>) 		<ul style="list-style-type: none"> - Goto & CS., 1999; Drakakaki & CS.,2000; Lucca & CS.,2002; Vasconcelos & CS., 2003, Liu & CS.,2004 - Nandi & CS., 2002; Suzuki & CS., 2003; Fujiyama & CS., 2004 - Qu & CS.,2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản, Thụy Sĩ, Philippin, Anh, Trung Quốc - Mỹ (2), Nhật Bản - Nhật Bản
- Làm giàu Pro-vitamine A, E (8)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Phytoene synthase (psy)</i> và <i>carotene desaturase (crtI)</i> - Gen <i>Phytoen synthase</i> từ cây Thủy tiên hoa vàng (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>) - Gen <i>Phytoene synthase (psy)</i> từ ngô, gen <i>carotene desaturase (crtI)</i> từ <i>Erwinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng hàm lượng β-caroten trong hạt gạo - Tăng hàm lượng β-caroten trong hạt gạo - Tăng hàm lượng β-caroten trong hạt gạo 	<ul style="list-style-type: none"> - Ye & CS., 2000; Beyer & CS., 2002; Trần Thị Cúc Hoà & CS, 2003; Paine & CS., 2005 - Burkhardt & CS.,1997 - Parkhi & CS.,2005 	<ul style="list-style-type: none"> - Thụy Sĩ(3), Đức, Việt Nam - Thụy Sĩ - Philippin

	<p><i>uredovora</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Phosphomannose isomerase (<i>pmi</i>), <i>psy</i> và <i>crtl</i> đã được tối ưu hoá - Gen <i>psy</i> và <i>crtl</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng hàm lượng β-caroten trong hạt gạo với gen thanh lọc <i>pmi</i> - Tăng hàm lượng β-caroten và γ-oryzanol trong hạt gạo 	<ul style="list-style-type: none"> - Trần Thị Cúc Hoà & CS, 2005 - Trần Thị Cúc Hoà & CS, 2003 	<ul style="list-style-type: none"> - Việt Nam - Việt Nam
- Cải thiện về thành phần acid béo (3)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>NtFAD3</i> (Fatty acid desaturase) - Gen <i>GmFAD3</i> (Microsomal omega-3 fatty acid desaturase) từ đậu tương - Gen Linoleate isomerase từ <i>Propionibacterium acnes</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Wakita & CS., 1998 - Anai & CS., 2003 - Kohno-Murase & CS., 2006 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản - Nhật Bản - Nhật Bản
- Cải thiện chất lượng dinh dưỡng dùng cho chăn nuôi (3)	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Phytase</i> - Gen <i>Phosphatase</i> từ <i>Lupinus albus</i> (LASAP2) 	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng hàm lượng phosphate dễ tiêu - Tăng hàm lượng phosphatase trong thân và hạt lúa 	<ul style="list-style-type: none"> - Hong & CS. , 2004; Hamada & CS., 2005 - Hamada & CS., 2004 	<ul style="list-style-type: none"> - Đài Loan, Nhật Bản - Nhật Bản
VI. Sản xuất dược liệu và sản phẩm tái tổ hợp (19)				
	<ul style="list-style-type: none"> - Gen Alpha 1- antitrypsin - Gen Cry j 1- japanese cedar pollen allergen - T-cell epitopes của <i>Cry j I</i> và <i>Cry j II</i> - Gen (<i>hIGF-1</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Sản xuất $\alpha 1$-antitrypsin - Sản xuất chất dị ứng nguyên do hạt phấn của cây tuyết tùng Nhật Bản - Sản xuất vacxin trong hạt gạo - Sản xuất nhân tổ kích 	<ul style="list-style-type: none"> - Terashima & CS., 1999 và 2001 - Okada & CS., 2002 - Takagi & CS., 2005 - Panahi & CS., 2004 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản (2) - Nhật Bản - Nhật Bản - Canada

	<ul style="list-style-type: none"> - Gen <i>Interferon-γ</i> (IFN-γ) - Gen mã hoá cho kháng thể tái tổ hợp scFv - Đoạn Fv chuỗi đơn (<i>scFvT84.66</i>) - Gen <i>Lysozyme</i> (<i>Hls</i>) - Gen <i>Transglutaminase</i> (<i>rTGp</i>) - Gen <i>albumin</i> của huyết thanh (<i>Has</i>) từ người - Nhân tố kích thích tập đoàn tế bào dạng meilin ở người (<i>hG-CSF</i>) - Gen chứa peptit số 1 giống như Glucagon (<i>GLP-1</i>) - Đoạn 1.7 kb từ Virus gây bệnh Newcastle (<i>NDVF</i>) - Antisense của 16 kDa allergen (<i>RA17</i>) từ lúa 	<p>thích sinh trưởng giống như insulin</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sản xuất interferon-gamma - Sản xuất kháng thể scFv - Sản xuất chất kháng thể (<i>scFvT84.66</i>) - Sản xuất lysozyme - Sản xuất transglutaminase - Sản xuất albumin của huyết thanh trong dung dịch huyền phù của lúa - Sản xuất nhân tố kích thích tập đoàn tế bào dạng meilin - Tạo giống lúa giàu protein giống như glucagon dùng điều trị bệnh tiểu đường - Sản xuất NDV F antigen - Giảm hàm lượng chất gây dị ứng (<i>RA17</i>) trong hạt gạo 	<ul style="list-style-type: none"> - Chen & CS., 2004 - Stoger & CS., 1999 - Torres & CS., 1999 - Huang & CS., 2002(a); Huang & CS., 2002(b); Yang & CS., 2001 và 2003; Hennegan & CS.,2005 - Claparols & CS., 2004 - Huang & CS.,2005 - Hong & CS.,2006 - Yasuda & CS.,2005 - Yang & CS.,2005 - Tada & CS.,1996 	<ul style="list-style-type: none"> - Đài loan - Anh - Anh - Mỹ (5) - Tây Ban Nha - Đài Loan - Hàn Quốc - Nhật Bản - Trung Quốc - Nhật Bản
VII. Kháng thuốc trừ cỏ (11)				

	<ul style="list-style-type: none"> - Cytochrome P450 - Gen <i>Protox</i> (protoporphyrinogen oxidase) - Chlorocatechol dioxygenase (<i>cbnA</i>) - Gen <i>Phosphinothricin-N-acetyltransferase</i> (<i>bar</i> hay <i>pat</i>) từ <i>Streptomyces hygroscopicus</i> - Gen <i>bar</i> và <i>hpt</i> - Gen <i>bar</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Kháng thuốc trừ cỏ nhóm glufosinate ammonium - Tạo giống lúa kháng thuốc trừ cỏ Basta - Tạo giống lúa kháng thuốc trừ cỏ Basta 	<ul style="list-style-type: none"> - Kawahigashi & CS., 2002, 2005; Hirose & CS., 2005; Inui & CS., 2001 - Lee & CS., 2000; Jung & CS., 2003 và 2005 - Shimizu & CS., 2002 - AgrEvo Co., 1999 - Datta & CS., 1992 - AgrEvo company, 1998 	<ul style="list-style-type: none"> - Nhật Bản (4) - Hàn Quốc (3) - Nhật Bản - Mỹ - Thụy Sĩ - Mỹ
--	---	--	--	---

3.1.1.8. Một số giống Lúa chuyển gen ở Việt Nam

♦ Giống lúa Nàng Hương Chợ Đào kháng sâu đục thân

Tác giả: Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển, Karabi Datta, Swapan Kumar Datta (Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Lúa Quốc tế)

- Phương pháp biến nạp : chuyển nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*
- Gen chuyển vào : Gen *cryIA(b)* và *cryIB*, gen *bar*
- Tính trạng thể hiện: Kháng sâu đục thân
- Plasmid sử dụng trong biến nạp: *pBIN-BAR-UBI-IB-AB* (Phòng nuôi cấy Nuôi cấy mô Tế bào Thực vật và Công nghệ Di truyền, Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế, Philippin)

Bằng việc sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen plasmid *pBIN-BAR-UBI-IB-AB*, các nhà khoa học thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới - TPHCM đã tạo ra được một số dòng cây lúa Việt Nam Nàng Hương Chợ Đào chuyển gen mang gen *Bt cryIA(b)-cryIB* kháng rất cao đối với sâu đục thân. Sự biểu hiện và sự hiện diện của gen kháng sâu cũng như gen chỉ thị đã được kiểm tra ở mức cá thể, mô tế bào và mức phân tử. Tuy nhiên cần phải tiếp tục các nghiên cứu về sự di truyền của các gen kháng sâu (và gen *bar*) và khả năng ứng dụng các dòng lúa nói trên vào công tác giống.

♦ Giống lúa DT10, DT13 chuyển gen kháng nấm đạo ôn

Tác giả: Trần Bích Lan, Nguyễn Đức Doanh, Nguyễn Lan Hoa, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (Viện Di truyền Nông nghiệp)

Năm 1994, Hiei và cộng sự đã thành công trong việc chuyển gen vào giống lúa Japonica. Năm 1996, Aldemita cũng đã chuyển gen vào giống lúa *Indica* thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Nhưng nhìn chung những nghiên cứu này đều thành công ở những giống lúa *Japonica* và một số giống *Indica* quen thuộc như IR54, IR72, ..., trong khi ở những giống lúa chất lượng cao kết quả còn rất hạn chế. Ở Việt Nam, Viện Di truyền Nông nghiệp cũng đã nghiên cứu biến nạp gen *chitinase* - kháng nấm đạo ôn vào hai giống lúa DT10, DT13.

- Phương pháp biến nạp: chuyển nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

- Vector sử dụng trong biến nạp: *pBI333-EN4-RCC₂*
- Gen chuyển vào: *chitinase*, gen kháng *hygromycin*
- Tính trạng thể hiện: kháng nấm đạo ôn

◆ Giống lúa Khao DAWK MALI chuyển gen

Tác giả: Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển, Niranjana Baisakh, Norman Oliva (Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Lúa quốc tế)

Thời gian gần đây các nhà chọn giống cây trồng đã thu được những tiến bộ đáng kể, bằng cách tạo ra những cây trồng mang gen lạ. Đặc biệt là những gen kháng bệnh, gen chống chịu môi trường khắc nghiệt, gen kháng sâu, gen kháng virus,... Các cây này thu được từ những phương pháp chuyển gen khác nhau nhưng với mục đích là đưa gen lạ vào bộ gen của cây chủ. Các phương pháp chuyển gen bằng phương pháp *Agrobacterium tumefaciens*, dùng chất kết dính ADN với tế bào trần, dùng chất kết dính ADN với tế bào trần, dùng xung điện, ... đã có thành công đáng kể trong những năm gần đây. Phương pháp chuyển gen qua ống phấn cũng đã được sử dụng và thu được kết quả bước đầu khả quan.

- Phương pháp biến nạp: chuyển nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*
- Plasmid sử dụng trong biến nạp : *pBI21*
- Gen chuyển vào: gen kháng kháng sinh, gen *GUS*

◆ Giống lúa Taipei 309 và VL901 chuyển gen kháng bệnh bạc lá

Tác giả: Phan Tổ Phụng, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý, Phạm Thu Hằng, C.M. Clauder, S.Zang, L.Chen, R.N.Beachy (Viện Di truyền Nông nghiệp)

Biến nạp thực vật là một trong những hướng mới quan trọng của Công nghệ Sinh học trong việc tạo ra các giống cây trồng có đặc tính mong muốn. Với sự tiến bộ vượt bậc của sinh học phân tử, đặc biệt trong lĩnh vực biến nạp, ngày nay nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã thành công trong việc chuyển những gen quan tâm vào thực vật, tạo ra những cây chuyển gen có khả năng kháng thuốc trừ cỏ, kháng sâu bệnh, kháng bệnh virus,...

Cho đến nay đã có nhiều phương pháp có thể sử dụng có thể sử dụng để chuyển gen vào thực vật như dùng phương pháp xung điện, PEG, hay súng bắn gen. Đối với cây 2 lá mầm người ta đã thu được kết quả tốt khi dùng *Agrobacterium*

tumefaciens để chuyển gen, nhưng đối với cây một lá mầm phương pháp dùng súng bắn gen mới đưa lại hiệu quả biến nạp cao nhất.

- Phương pháp biến nạp : Sử dụng súng bắn gen
- Tính trạng thể hiện : Kháng bệnh bạc lá lúa
- Gen chuyển vào: Gen *Xa21*
- Vector sử dụng trong biến nạp: *pAHC27*, *pC822*

♦ Giống lúa Việt Nam Tài nguyên (IRGC 84854) chuyển gen kháng sâu

Tác giả: Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển, Swapan Datta (Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Lúa quốc tế)

- Phương pháp biến nạp : Sử dụng súng bắn gen
- Gen chuyển vào: *CryIA(c)*, *CryIA(b)*
- Vector sử dụng trong biến nạp: mang gen *Bt* phối hợp (fused) *CryIA(b)* – *CryIA(b)* kháng sâu (1,8 kb, promoter Actin 1) và plasmid pRoB5 mang gen *hph* kháng Hygromycin (1,1 kb, promoter *CaMV* 35S). Hai loại plasmid nói trên được tổ hợp với tỷ lệ 4:1.
- Tính trạng thể hiện : Kháng sâu đục thân

Bằng phương pháp sử dụng thiết bị bắn gen trên tế bào huyền phù giống lúa Việt Nam Tài Nguyên, các nhà khoa học thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới – TP.HCM đã thu nhận được một số dòng cây chuyển gen mang gen *CryIA(b)*- *CryIA(c)* kháng sâu đục thân. Sự biểu hiện và hiện diện của gen kháng sâu cũng như gen chỉ thị đã kiểm tra ở mức độ phân tử. Sự di truyền của gen kháng sâu (cũng như gen kháng Hygromycin), sự phân li các tính trạng tương ứng và khả năng ứng dụng các dòng lúa nói trên và công tác giống đang được nghiên cứu.

♦ Giống lúa Taipei 309, IR64, MTL chuyển gen giàu vi chất dinh dưỡng

Tác giả: Trần Thị Cúc Hoà và cộng sự (Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long)

- Phương pháp biến nạp : chuyển nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens*
- Gen chuyển vào: gen *psy*, *crtI* cần cho quá trình sinh tổng hợp β -carotene và gen chọn lọc Phosphomannose isomerase (*pmi*)
- Plasmid sử dụng trong biến nạp: *pCaCar* (Hoà và CS, 2003) và *pFun3*
- Tính trạng: Gia tăng hàm lượng pro-vitamin A và vitamin E

Các nhà khoa học thuộc Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long đã sử dụng ba giống lúa IR64, MTL250 (indica) và Taipei 309 (japonica) để làm đối tượng chuyển nạp, với các vectơ *pCaCar* và *pFun3* mang gen *psy* và *crtI* điều khiển lộ trình tổng hợp isoprenoid để tạo ra một số vi chất dinh dưỡng, bằng phương pháp sử dụng *Agrobacterium* và hệ thống chọn lọc mannose. Kết quả là đã tạo ra các dòng lúa biến đổi gen chứa carotenoid, trong đó hợp phần chủ yếu là β -carotene (tiền vitamin A) có hàm lượng cao, trong khi giống đối chứng không biến đổi gen hoàn toàn không có carotenoid. Điều đặc biệt là các dòng biến đổi gen với vectơ *pCaCar*, hạt gạo biểu hiện cả β -carotene và các hợp chất vitamin E (tocopherols) vì ở nội nhũ của hạt gạo non có sự hiện diện của geranyl geranyl diphosphate (GGPP) - một tiền chất quan trọng trong tiến trình sinh tổng hợp β -carotene cũng như các hợp chất vitamin E. Ngoài ra trong một số dòng lúa biến đổi gen còn thấy chất γ -oryzanol gia tăng đáng kể, đây là chất chống oxy hóa có vai trò còn quan trọng hơn cả vitamin E.

3.1.1.9. Thông tin về thực phẩm biến đổi gen

Thực phẩm biến đổi gen đã, đang được phát triển và bán trên thị trường. Mặc dù thực phẩm biến đổi gen còn ít được dùng ở các nước Châu Âu bởi những lo ngại về các ảnh hưởng liên quan đến sức khỏe người tiêu dùng, nhưng chúng lại được chấp nhận rộng rãi ở nhiều nước đang phát triển như Trung Quốc, Argentina và cả ở một số nước phát triển như Mỹ và Canada. Người ta ước tính hiện nay trên thế giới có hơn một nửa đậu tương và khoảng một phần ba ngũ cốc được trồng từ những hạt giống có chuyển gen chống côn trùng và bệnh cây.

Một ví dụ điển hình về thực phẩm biến đổi gen là giống lúa mới cho hạt gạo vàng. Giống lúa mới này được công bố năm 1999 đã đáp ứng nguyện vọng cho những người dùng gạo làm nguồn lương thực chính. Loại gạo này đặc biệt giàu Vitamin A và sắt - đó là 2 chất vi lượng rất cần cho cơ thể nhưng lại đang thiếu phổ biến trong khẩu phần của người dân thuộc thế giới thứ 3. Hiện nay, hầu hết các thực phẩm biến đổi gen đều là các sản phẩm có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen. Tất cả các cây trồng biến đổi gen hiện có mặt trên thị trường quốc tế đều có một trong ba đặc tính cơ bản sau: kháng sâu; kháng virus và kháng một số loại thuốc diệt cỏ. Tất cả các gen được dùng đối với các loại cây trồng biến đổi gen này đều có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Bảng 5: Một số cây trồng biến đổi gen được cấp phép dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
0	1	2	3	4	5	6
Ngô (28)						
1	YieldGard Corn (LH82/A634)/ (Mon 863)	Monsanto	<i>Cry3Bb1 / Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis</i>	Bắn gen / Phân tích Southern	2001	Chấp nhận phóng thích ở Mỹ, Canada, Philippin, Nhật Bản làm thực phẩm và thức ăn gia súc; châu Âu làm thức ăn gia súc; Úc và Đài loan làm thực phẩm
2	YieldGard®/ (Mon 810)	Monsanto	<i>CryIA(b) / Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)</i>	Bắn gen / ELISA	1996	Trồng rộng rãi ở Mỹ từ 1995, được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Argentina, Canada, Nhật Bản, Philippin, Nam Phi, Tân tây lan; thực phẩm ở Úc, Hàn quốc và Đài loan
3	Mon80100	Monsanto	<i>CryIA(b) / Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk), pat / Strep -tomyces viridochromogenes</i>	Bắn gen	1996	Dùng là thực phẩm và/hoặc thức ăn gia súc ở Mỹ
4	YieldGard/(Bt 11)	Syngenta Seeds AG	<i>CryIA(b) / Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk), pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Bắn gen	1996	Chấp nhận phóng thích ở Mỹ, Canada, Argentina, Úc, Trung quốc, Nam Phi, Philippin, Thụy sĩ, Anh, Uraquay và Nhật Bản làm thực phẩm và thức ăn gia súc; các nước Nga, Đài loan, Hàn Quốc làm thực phẩm
5	NatureGardTM / (176 (SYN- EV176-9))	Syngenta Seeds AG	<i>CryIA(b) / Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk), bar/ Streptomyces hygroscopicus</i>	Bắn gen	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Úc, Mỹ, Philippin, Châu Âu, Hà lan, Thụy sĩ; thực phẩm ở Đài loan, Anh

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
6	YieldGard®/ MON802	Monsanto	<i>CryIA(b)</i> / <i>Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki</i> (Btk), <i>cp4 epsp</i> / <i>Agrobacterium sp. strain CP4</i> , <i>goxv247</i> / <i>Ochrobactrum anthropistrain LBAA</i>	Bắn gen	1997	Thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ
7	YieldGard®/ MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	<i>CryIA(b)</i> / <i>Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki</i> (Btk), <i>cp4 epsp</i> / <i>Agrobacterium sp. strain CP4</i> ,	Bắn gen	1996	Thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thức ăn gia súc ở Nhật Bản
8	MON832	Monsanto	<i>cp4 epsp</i> / <i>Agrobacterium sp. strain CP4</i> , <i>goxv247</i> / <i>Ochrobactrum anthropistrain LBAA</i>	Bắn gen	1997	Thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada
9	Bt Xtra®/DBT418	Dekalb Genetics Corporation	<i>cry IAc</i> / <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i> (Btk), <i>bar</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Bắn gen	1997	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Mỹ, Philippin; thực phẩm ở Nhật Bản, Úc và Đài loan
10	Roundup ready corn/ GA21 (MON21-9)	Monsanto	<i>EPSPS</i> / <i>Zea mays</i>	Phôi non của giống AT824/ bắn gen	1997	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Mỹ, Philippin; thực phẩm ở Đài loan, Úc và Hàn quốc; thức ăn gia súc ở Châu Âu
11	Roundup ready corn 2 / NK603	Monsanto	<i>CP4-EPSPS</i> / <i>Agrobacterium sp. strain CP4</i>	Phôi non / bắn gen / RT-PCR, Phân tích Southern	2000	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Mỹ, Nam Phi; thực phẩm ở Đài loan, Úc; thức ăn gia súc ở Nam Phi, Châu Âu.

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
12	Herculex I / TC1507 (DAS1507)	Pioneer Hi- Bred Inter- national, Inc., Mycogen Seeds/Dow AgrSciences L.L.C.	<i>cry1Fa2 / Bacillus thuringiensis</i> <i>var. aizawai</i> <i>pat / Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i>	Bắn gen / Phân tích Southern, Northern, Direct DNA sequencing, ELISA	2001	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Mỹ, Philippin, Nam Phi; thực phẩm ở Đài loan, Úc; thức ăn gia súc ở Châu Âu
13	MON863 X MON810 X NK603	Monsanto	<i>Cry3Bb1 / Bacillus</i> <i>thuringiensis subsp.</i> <i>kumamotoensis, CryIA(b) /</i> <i>Bacillus thuringiensis subsp.</i> <i>kurstaki (Btk) và CP4-EPSPS</i> <i>/Agrobacterium sp.strain CP4</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền / Phân tích Southern	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Nhật Bản và Philippin
14	YieldGard Corn Roundup Ready 2 / MON863 x NK603	Monsanto	<i>Cry3Bb1 / Bacillus</i> <i>thuringiensis subsp.</i> <i>kumamotoensis,</i> <i>CP4-EPSPS /Agrobacterium</i> <i>sp.strain CP5</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền / Phân tích phân tử đoạn ADN xen	2004	
15	Monsanto YieldGard Roundup Ready2 / MON 810 x NK603	Monsanto	<i>CryIA(b) / Bacillus</i> <i>thuringiensis subsp.kurstaki</i> <i>(Btk), và CP4-</i> <i>EPSPS /Agrobacterium</i> <i>sp.strain CP4</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản và Philippin, thực phẩm ở Mexico và Hàn Quốc
16	Monsanto YieldGard Roundup Ready/ GA 21x MON810	Monsanto	<i>CryIA(b) /Bacillus thuringiensis</i> <i>subsp.kurstaki (Btk) và</i> <i>epsps / Zea mays</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền	2003	Dùng làm thức ăn gia súc ở Nhật Bản và Philippin

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
17	T25 x MON 810 (ACS-ZM003-2 x MON810-6)	Bayer Crop- Science	<i>CryIA(b) / Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki (Btk) và pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền	2003	Dùng làm thức ăn gia súc ở Nhật Bản
18	StarLinkTM /CBH 351	Aventis Crop-Science	<i>Cry9C / Bacillus thuringiensis subsp. Tolworthi và bar/ Streptomyces hygroscopicus</i>	Bắn gen	1998	Dùng làm thức ăn gia súc ở Mỹ
19	DAS-06275-8 (TC-6275)	Dow Agro- Science L.L.C.	<i>CryIF / Bacillus thuringiensis var. aizawai</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
20	DAS-59122-7	Dow Agro- Science L.L.C.	<i>cry34Ab1, cry35Ab1 / Bacillus thuringiensis strain PS149B1, pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ; thực phẩm ở Úc và Mexico
21	MON88017	Monsanto	<i>Cry3Bb1 / Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis strain EG4691, CP4-EPSPS / Agrobacterium sp. strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2005	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
22	DAS1507 x MON603-6	Dow Agro- Science L.L.C.	<i>CryIF / Bacillus thuringiensis var. aizawai, CP4-EPSPS / Agrobacterium sp. strain CP4, pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ truyền	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản; thực phẩm ở Hàn quốc và Mexico
23	676, 678, 680	Pioneer Hi- Bred Inter- national, Inc	<i>pat / Streptomyces virido- chromogenes, dam / Escherichia coli</i>	Bắn gen	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
24	Liberty Link™ / T14	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Tế bào trần / Phân tích Southern, ELISA	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Úc, Mỹ.
25	Liberty Link™ / T25	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Tế bào trần / Phân tích Southern, ELISA	1996	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Argentina, Nhật Bản, Úc, Mỹ, Philippin, Châu Âu; thực phẩm ở Đài loan
26	DLL25 (B16)	Dekalb Genetics Corporation	<i>bar/ Streptomyces hygroscopicus</i>	Bản gen/ Southern	1996	Dùng làm thực phẩm ở Đài loan; thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Nhật Bản, Canada và Philippine
27	InVigor® /MS3	Bayer Crop- Science	<i>barnase / Bacillus amyloliquefaciens, pat / Strep- tomyces viridochromogenes</i>	phôi non /điện áp cao	1996	Thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ
28	InVigor®/ MS6	Bayer Crop- Science	<i>barnase / Bacillus amyloliquefaciens, pat / Strep- tomyces viridochromogenes</i>	phôi non /điện áp cao	1999	Thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
Cải dầu (20)						
29	Westar Roundup ready® /RT73 (GT 73)	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp. strain CP4, goxv247 / Ochro- bactrum anthropi strain LBAA</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1995	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Philippin, Mỹ, Châu Âu; thực phẩm ở Úc
30	Liberty Link™ Innovator / HCN92	AgrEvo	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Phân tích Southern	1995	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản và Canada; thực phẩm ở Mỹ

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
31	PHY 14	Plant Genetic System	<i>bar/ Streptomyces hygroscopicus barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1997	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Úc và Mỹ
32	PHY 35	Plant Genetic System	<i>bar/ Streptomyces hygroscopicus, barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1997	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Úc và Mỹ
33	MS1	Plant Genetic System	<i>bar/ Streptomyces hygro- copicus, barnase / Bacillus amyloliquefaciens,</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, Southern Northern;	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Úc và Mỹ
34	RF1	Plant Genetic System	<i>bar / Streptomyces hygroscopicus, barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, Southern Northern;	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Úc và Mỹ
35	PGS1 (MS1xRF1)	Plant Genetic System	<i>bar / Streptomyces hygro- copicus, barnase / Bacillus amyloliquefaciens, barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tạo con lai F1	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Úc và Mỹ
36	RF2	Plant Genetic System	<i>bar/ Streptomyces hygro- copicus, barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, Southern Northern;	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản
37	PHY 36	Plant Genetic System	<i>bar/ Streptomyces hygro- copicus, barstar / Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1997	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
38	PGS2 (MS1xRF2)	Plant Genetic System	<i>bar</i> / <i>Streptomyces hygro-</i> <i>copicus</i> , <i>barnase</i> / <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>barstar</i> / <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tạo con lai F1	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản
39	MS8xRF3	Plant Genetic System	<i>bar</i> / <i>Streptomyces hygro-</i> <i>copicus</i> , <i>barnase</i> / <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>barstar</i> / <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada, Mỹ, Úc
40	Liberty Link™ / HCN10	AgrEvo	<i>pat</i> / <i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1995	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Mỹ và Canada
41	MS8	Plant Genetic System	<i>pat</i> / <i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i> , <i>barnase</i> / <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> ,	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, Southern Northern;	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Mỹ và Canada
42	RF3	Plant Genetic System	<i>pat</i> / <i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i> , <i>barstar</i> / <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, Southern Northern;	1996	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản
43	WESTAR-Oxy- 235	Rhone- Poulence	<i>bxn</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. ozanae</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> /Southern, PCR	1997	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản, Canada; thực phẩm ở Mỹ, Úc
44	PHY23	Plant Genetic System	<i>bar</i> / <i>Streptomyces hygro-</i> <i>copicus</i> , <i>barstar</i> / <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>		Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Nhật Bản
45	Roundup ready /RT200 (GT200)	Monsanto	<i>CP4-EPSPS</i> / <i>Agrobacterium sp.</i> <i>strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2002	Được sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, thực phẩm ở Canada

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
46	HCN 28 (T45)	Bayer Crop Sci.	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc, Canada, Nhật Bản và Mỹ
47	Laurical TM / 23- 18-17, 23-198	Monsanto	mã hoá teoterase / <i>Umbellularia californica</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Mỹ
Khoai tây (24)						
48	NewLeaf Russet Burbank / BT6, BT10, BT12, BT16, BT17, BT18, BT23	Monsanto	<i>cry3A / Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Phân tích Southern	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc, Canada, Philippin và Mỹ; làm thực phẩm ở Nhật Bản
49	NewLeaf Atlantic / ATB04-27, ATB04-36	Monsanto	<i>cry3A / Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Phân tích Southern	1996	Chấp nhận dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Úc
50	NewLeaf Atlantic / ABT04-6, ABT04-30, ABT04-31	Monsanto	<i>cry 3A / Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Phân tích Southern	1996	Chấp nhận dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Úc
51	NewLeaf Plus / RBMT21-129, RBMT21-350, RBMT22-82	Monsanto	<i>cry 3A / Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis , PLRVrep / potato leafroll virus replicase</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1998	Chấp nhận dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Úc và Nhật Bản

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
52	NewLeaf Plus / RBMT21-82, RBMT21-186, RBMT21-238 RBMT21-262	Monsanto	<i>cry 3A / Bacillus thuringiensis</i> <i>subsp. Tenebrionis</i> , <i>PLRVrep / potato leafroll virus</i> <i>replicase, CP4-EPSPS</i> <i>/Agrobacterium sp.strain CP4</i>			Chấp nhận trồng dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
53	NewLeaf® potato / SBT02-5, SBT02-7	Monsanto	<i>cry3A / Bacillus thuringiensis</i> <i>subsp. Tenebrionis</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern		Chấp nhận dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Úc và Nhật Bản
54	NewLeaf YTM / RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15	Monsanto Japan	<i>cry 3A / Bacillus thuringiensis</i> <i>subsp. Tenebrionis</i> <i>PVY CP / potato potyvirus Y</i> <i>(PVY) strain O (common strain)</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1998	Chấp nhận dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Úc
Củ cải đường (3)						
55	Roundup ready sugar beet /H7-1	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp.</i> <i>strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / PCR, ELISA	2004	Sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Philippin; dùng làm thực phẩm ở Canada, Úc
56	Roundup ready sugar beet / 77 (GTSB77)	Monsanto, Syngenta Seeds AG	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp.</i> <i>strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, Western, ELISA	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc, Philippin và Mỹ
57	T120-7	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / ELISA	1998	Sử dụng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada
Đậu tương (11)						

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
58	Roundup ready soybean / 40-3-2 (GTS40-3-2)	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp.strain CP4</i>	Giống A5403/Bắn gen/ Phân tích Southern, Western; PCR, ELISA	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Canada, Argentina, Braxin, Cộng hoà Séc, Nhậ, Mexico, Philippin, Nam phi, Thụy sĩ, Anh, Uraquay; thực phẩm ở Úc, Hàn Quốc, Nga, Đài loan
59	G94-1, G94-19, G168	Optimun Quality Grains L.L.C.	<i>GmFat2-1/Glycine max</i>	Giống A2396/Bắn gen/ PCR, Southern	1997	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Nhật Bản, Mỹ và thực phẩm ở Úc
60	W62, W98	Bayer Crop- Science	<i>bar/ Streptomyces hygroscopicus</i>	Bắn gen	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
61	A2704-12, A2704-21, A5547-35	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Bắn gen	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Nhật Bản và Mỹ và thực phẩm ở Úc
62	A5547-127	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Bắn gen	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
63	GU 262	Bayer Crop- Science	<i>pat / Streptomyces viridochromogenes</i>	Bắn gen/ Phân tích Southern	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
Cà chua (6)						
64	Flavr Savr™ / CGN-89564-2	Calgen Inc.	gen mã hoá PG / cà chua	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1992	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Mexico; thực phẩm ở Canada và Nhật Bản

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
65	1345-4	DNA Plant Tech- Corporation	đoạn 1-ACC synthase gen / tomato	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ; thực phẩm ở Canada
66	5345	Monsanto	<i>CryIA(c)</i> / <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i> (Btk)	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ; thực phẩm ở Canada
67	CGN-89322-3 (8338)	Monsanto	<i>accd</i> / <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
68	B,Da,F	Zeneca Seeds	đoạn PG gen / cà chua	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ; thực phẩm ở Canada
69	35 1N	AgriTope Inc.	gene mã hoá SAMase / <i>E. coli</i> bacteriophage T3	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1996	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
Lúa mì						
70	Roundup ready wheat® / MON71800	Monsanto	<i>CP4-EPSPS</i> / <i>Agrobacterium sp.strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ
Đu đủ						
71	55-1 , 63-1	Đại học Cornell	coat protein virus / <i>papaya ringspot potyvirus (PRSV)</i>	Bản gen	1997	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc
Dưa						
72	A, B	AgriTope Inc.	<i>sam-k</i> / <i>E. coli</i> bacteriophage T3	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>		Đăng ký dùng làm thức ăn tươi hoặc chế biến nhưng đã rút đơn tháng 11/1999
Bí đỏ (2)						

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
73	CZW-3	Asgrow (USA), Seminis Veg. Inc. (Canada)	Đoạn mã hoá coat protein virus / <i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> , <i>Watermelon mosaic potyvirus 2</i> và <i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Mỹ
74	ZW20	Upjohn (USA), Seminis Veg. Inc. (Canada)	Đoạn mã hoá coat protein virus/ <i>Watermelon mosaic potyvirus 2</i> và <i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Mỹ
Bông vải (15)						
75	Liberty® / LLcotton25	Bayer CropSci.	<i>bar /Streptomyces hygroscopicus</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, PCR	2003	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Và Mỹ
76	Roundup Ready® / Mon1445,	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp. strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, ELISA	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Argentina, Philippin, Nhật Bản và Canada; thực phẩm ở Úc
77	Roundup Ready® / Mon1698	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp. strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, ELISA	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ, Nhật Bản và Canada; thực phẩm ở Úc
78	Roundup Ready® Flex / Mon88913	Monsanto	<i>CP4-EPSPS /Agrobacterium sp. strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, PCR	2005	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Mỹ

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
79	Bollgard II®/Mon15985-7	Monsanto	<i>CryIA(c) / Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki;</i> <i>cry2Ab / Bacillus thuringiensis</i>	Bản gen/ Phân tích Southern, ELISA	2003	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Nhật Bản và Phi lippines
80	DAS24236-5 (281-24-236)	Dow Agro-Sciences LLC	<i>CryIF / Bacillus thuringiensis (Bt) var. aizawai</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, ELISA	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, và Mỹ; thức phẩm ở Mexico
81	DAS-21023-5 (3006-210-23)	Dow Agro-Sciences LLC	<i>CryIA(c) / Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern, ELISA	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Mexico và Mỹ
82	SYN-IR102-7 (COT102)	Syngenta Seeds, Inc	<i>vip3A(a) / Bacillus thuringiensis strain AB88.</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Southern	2005	Dùng làm thực phẩm ở Mỹ và Úc
83	WideStrike™/ DAS-21023-5 x DAS-24236-5	Dow Agro-Sciences LLC	<i>rcy1F / Bacillus thuringiensis (Bt) var. aizawai</i> <i>CryIA(c) / Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ điển	2004	Dùng làm thực phẩm ở Úc, Nhật Bản, Mexico và Mỹ
84	Bollgard II® / Mon 531-6	Monsanto	<i>CryIA(c) / Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc, Trung quốc, Argentina, Mexico, Nam Phi, Philippin, Canada, Nhật Bản, Braxin và Mỹ
85	Bollgard II®/ Mon757-7, Mon1576	Monsanto	<i>CryIA(c) / Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1995	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada, Nhật Bản, Braxin và Mỹ

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp biến nạp/ PP phân tích	Năm phóng thích	Hiện trạng
86	WideStrike™/Roundup Ready® / DAS-21Ø23-5 x DAS-24236-5 x MON-Ø1445-2	Dow Agro- Sciences LLC	<i>CryIF / Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) var. <i>aizawai</i> <i>CryIA(c) / Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> <i>CP4-EPSPS / Agrobacterium</i> <i>sp. strain CP4</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ điển	2005	Dùng làm thực phẩm ở Mexico
87	MON-15985-7 x MON-Ø1445-2	Monsanto	<i>CryIA(c) / Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> <i>cry2Ab / Bacillus thuringiensis</i> <i>CP4-EPSPS/ Agrobacterium sp.</i> <i>strain CP4</i>	Chọn tạo theo phương pháp lai cổ điển	2004	Dùng làm thực phẩm ở Philippin và Nhật Bản
88	BXN™/ BXN	Calgen Inc.	<i>bxn / Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. zaenae</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	1994	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Úc, Canada, Nhật Bản và Mỹ
89	CDC Triffid/ CDC-Fuc001-2 (FP967)	Đại học Saskat- chewan, Crop Dev. Center	<i>als / Arabidopsis thaliana</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> / Phân tích Southern	1998	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ
90	J101, J163	Monsanto Company ADN Forage Genetics International	<i>CP4-EPSPS / Agrobacterium sp.</i> <i>strain CP4</i>	Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	2004	Dùng làm thực phẩm và thức ăn gia súc ở Canada và Mỹ; thực phẩm ở Mexico

Bảng 6: Một số chất phụ gia dùng trong thực phẩm có nguồn gốc từ GMOs

Stt	Loại	Sản phẩm	Tác giả/ Cơ quan	Gen hữu dụng/Nguồn gốc	Phương pháp xét nghiệm	Hiện trạng	Ứng dụng / Tính trạng	Tài liệu tham khảo
1	Lipase	IUB3.1.1.3	Novo Nordisk	lipase / <i>Rhizomuc or meihie</i>	Southern		Acid béo cao cho công nghệ sản xuất bơ sữa	http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A402_FA.pdf
2	Lipase	SP388	Novozymes A/S			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
3	Lipase	NOVOZY M677	Novozymes A/S				Hiệu suất cao	
4	a-Amylase	TS-25	Novozymes A/S			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
5	α -Amylase	BSG- Amylase	Novozymes A/S			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
6	α -Amylase	TMG- Amylase	Novozymes A/S			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
7	α -Amylase	SP961	Novozymes A/S				Hiệu suất cao	
8	Rennet	Maxiren	Gist.Bro- cades N.V.			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
9	Rennet	CHY- MAX	Chr.Hansen A/S				Hiệu suất chất rennet	
10	Pullulanase	Optimax	Genencor Internationa l, Inc. (USA)			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
11	Pullulanase	SP962	Novozymes A/S				Hiệu suất cao	

12	Riboflavin	Ribiflavin (vitamin B2)	F. Hoff- man-La			Nhật Bản phê duyet	Hiệu suất cao	http://www.foodnavigator.com/news/printNewsBis.asp?id=40603
13	Glucos- amylase	AMG-E	Novozymes A/S				Hiệu suất cao	
14	α -Amylase	SPEZYM FRESH™	Genencor International, Inc. (USA)			Genencor Kyowa Co., Ltd.	Chịu nhiệt	http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodpdfsec01-2.pdf
15	α -Amylase	LE399	Novozymes A/S (Denmark)			Novozymes Japan Ltd.	Hiệu suất cao	http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodpdfsec01-2.pdf

Bảng 7: Một số enzyme từ vi sinh vật biến đổi gen được dùng trong sản xuất thực phẩm

Enzyme	Sinh vật chủ	Sinh vật nhận	Sản phẩm
alpha-acetolactate decarboxylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Đồ uống
alpha-amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống
	<i>Bacillus lichenformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, trái cây, đường, bánh mỳ
Catalaza	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	trứng, sữa
Chymosin	<i>Aspergillus niger var. awamori</i>	<i>Calf stomach</i>	Pho mát
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Calf stomach</i>	Pho mát
Cyclodextrin-glucosyl transferase	<i>Bacillus lichenformis</i>	<i>Thermoanbacter sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột
Beta-glucanase	<i>Bacillus amyloliquefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống
	<i>Trichoderma reesei or longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, thức ăn dành cho người ăn kiêng
Glucose isomerase	<i>Streptomyces lividans</i>	<i>Actioplanes sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột
	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột
Glucose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Trứng, bánh mỳ, đồ uống, salad
Hemicellulase	<i>Bacillus amyloliquefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Bánh mỳ

Lipase, triacylglycerol	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida sp.</i> <i>Rhizomucor sp.</i> <i>Humicola sp.</i>	Chất béo, bánh mỳ
Maltogenic amylase	<i>Bacillus amyloli- quefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizomucor sp.</i>	Phomát
	<i>Bacillus amyloli- quefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Thịt, cá, ngũ cốc và thực phẩm có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ
	<i>Bacillus lichenformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Thịt, cá
Pullulanase	<i>Bacillus lichenformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột
	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ
Xylanase	<i>Aspergillus niger var. awamori</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Bánh mỳ
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ
	<i>Bacillus amyloli- quefaciens or subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ
	<i>Bacillus lichenformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột
	<i>Trichoderma reesei or longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	Ngũ cốc và thức ăn có chứa tinh bột, đồ uống, bánh mỳ

3.1.2. Thông tin về thức ăn gia súc có nguồn gốc từ cây trồng biến đổi gen

3.1.2.1. Sản phẩm GMC có trong thức ăn gia súc

Bảng 8 : Các thông tin liên quan đến sản phẩm GMCs có trong thức ăn gia súc

Tính trạng	Yếu tố di truyền	Nguồn gốc của gen
Kháng sâu	<i>Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 9C, Cry 3A, Cry 1F</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Kháng sâu thuốc trừ cỏ glufosinate	Phosphinothricin N-acetyltransferase (<i>PAT</i>)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> hoặc <i>S. Virido chromogenes</i>
Kháng sâu thuốc trừ cỏ glyphosate	5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphat synthase (<i>EPSPS</i>)	Chủng CP4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hoặc enzym nội sinh của ngô đã cải biến
Tính bất dục đực	barnase ribonuclease	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kháng sâu thuốc trừ cỏ Sulffonyl urea	Dạng biến dị của acetolactate synthase	<i>Nicotlana tabacum</i> (thuốc lá)
Kháng sâu thuốc trừ cỏ Oxynil	Nitrilase	<i>Klebsiella pneumoniae Subsp.</i>
Dữ liệu acid béo của hạt đã cải biến	Delta-12 desaturase	<i>Glycine max</i> (đậu tương); Huyền phù phối hợp của enzym nội sinh
Kháng virus	Helicase / replicase của protein vỏ bọc	Virus xoắn lá ở khoai tây

+ Protein *Bt*: Gen cry mã hoá delta-endotoxin mà đã được biểu hiện ở nhiều GMCs để kháng côn trùng thuộc bộ cánh vảy hoặc cánh cứng. Các protein này tham gia trực tiếp vào các vị trí liên kết đặc hiệu trong côn trùng đích. Chúng không có vị trí liên kết đối với delta-endotoxin của *Bacillus thuringiensis* trên bề mặt của các tế bào ruột ở động vật có vú. Vì vậy động vật nuôi và con người không miễn cảm với các protein này.

+ Các protein chống chịu thuốc trừ cỏ: Enzym 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphat synthase (*EPSPS*) đóng vai trò quan trọng trong con đường sinh hoá mà kết quả là tổng hợp ra các axit amin thơm như phenylalanine, tyrosine và tryptophan. Enzym này chỉ có mặt trong cây trồng và vi sinh vật (vi khuẩn, nấm) và không có mặt trong động vật và con người. Vì vậy *EPSPS* thường có trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ các giống cây trồng mới và vi sinh vật. Trình tự axit amin của *EPSPS*, cho thấy có sự tương đồng với protein *EPSPS* nội sinh trong thực phẩm.

+ Tính kháng virus: chỉ có khoai tây là 1 trong những cây trồng có tính kháng virus được sử dụng làm thức ăn gia súc. Tính kháng với virus Y ở khoai tây (PVY-Potato virus Y) và virus gây bệnh xoắn lá khoai tây (PLRV-Potato leaf roll virus) đã được đưa

vào nhờ chuyển được trình tự gen tương ứng với protein vỏ của virus (CP-Coat protein) hoặc enzym replicase của virus ở khoai tây. Mà các CP có lịch sử lâu dài về tính an toàn đối với người và động vật nuôi. Các protein của virus ở cây (có nguồn gốc từ PVY hay bất kỳ virus của khoai tây nào khác) không bao giờ kết hợp với protein của người để tạo ra đặc tính độc hoặc các trường hợp gây dị ứng ở người.

3.1.2.2. Tính an toàn của các sản phẩm thức ăn gia súc có nguồn gốc từ GMCs

Tổ chức Thuốc và Thực phẩm Mỹ (FDA) đã cho rằng tất cả các loại thức ăn gia súc có nguồn gốc từ các giống cây trồng mới, bao gồm cả GMCs đều có tính an toàn khi đánh giá so sánh về thành phần dinh dưỡng, tính độc, về mức độ phân tử của loại thức ăn chăn nuôi này với loại thức ăn chăn nuôi thông thường (không chứa GMO), và xem xét tính an toàn kể cả về khía cạnh con người tiêu thụ sản phẩm động vật ăn loại thức ăn chăn nuôi mới đó:

+ Các protein nói chung không có hoạt tính gây đột biến, gây quái thai hoặc gây ung thư. Không có bất kỳ 1 dữ liệu nào chỉ ra rằng các protein này có thể tương tác với ADN để làm tăng các tác động về đột biến.

Bảng 9: Tóm tắt về mức độ không ảnh hưởng (NOEL) đã quan sát dựa trên các nghiên cứu về tính độc đối với các protein mới đã biểu hiện trong GMCs

Protein	Cây trồng	NOEL (mg/ kg trọng lượng cơ thể)
<i>Cry 1Ac</i>	Bông, cà chua	4200
<i>Cry 1Ab</i>	Ngô	4000
<i>Cry 2Aa</i>	Bông	3000
<i>Cry 2Ab</i>	Ngô, bông	3700
<i>Cry 3A</i>	Khoai tây	5200
<i>CP4-EPSPS</i>	Đậu tương, bông, cải dầu, củ cải đường, ngô	572
<i>mz EPSPS</i>	Ngô	350
<i>nptII</i>	Bông, khoai tây, cà chua	5000
<i>GUS</i>	Củ cải đường	100
<i>GOX</i>	Cải dầu	100
<i>ACC deamiase</i>	Khoai tây	602

+ Về thành phần dinh dưỡng: khi nghiên cứu trên bò và gia cầm sử dụng thức ăn có chứa GMCs và chứa cây trồng không chuyển gen cho thấy không có sự khác nhau về thành phần dinh dưỡng.

+ Liệu ADN của các gen đã được chuyển hoặc các sản phẩm protein của chúng có được chuyển vào và tích lũy trong sản phẩm thực phẩm (sữa, thịt, trứng) của động vật ăn thức ăn có nguồn gốc từ GMCs hay không? và khi con người tiêu thụ các sản phẩm động vật này thì có những tác hại gì đến sức khỏe của con người hay không ?

Tất cả các nghiên cứu đã đưa ra bằng chứng cho thấy rằng là chúng an toàn và không ảnh hưởng gì đến sức khỏe con người.

Bảng 10: Độ bền vững của các protein đã đưa vào để tiêu hoá trong dịch vị

Protein	Lượng dư thừa tương đối (% protein tổng số)	Độ bền (giây)
<i>Cry 1A</i>	< 0,01	30
<i>Cry 2</i>	< 0,01	< 15
<i>Cry 3A</i>	< 0,01	< 15
<i>CP4-EPSPS</i>	< 0, 1	< 15
<i>mz EPSPS</i>	< 0,05	< 15
<i>GOX</i>	< 0,01	< 15
<i>GUS</i>	< 0,01	< 15
<i>nptII</i>	< 0,01	< 10

3.1.2.3. Sự phân bố và thương mại hoá của các sản phẩm thức ăn gia súc có nguồn gốc từ GMCs

Bảng 11: Sự thương mại hoá của các sản phẩm thức ăn gia súc có chứa GMCs

Loại GMCs có trong thức ăn gia súc	Các quốc gia phê chuẩn sản phẩm này	Năm được thương mại hoá
Đậu tương	Canada	1995
	Argentina	1996
	Úc	2000
	Nhật Bản	1996
	Nam Phi	2001
	Hà lan	1996
	Thụy sĩ	1996
	Braxin	1998
	Mexico	1998
	Nga	1996

	Uruguay	1997
Ngô	Canada	1996
	Argentina	1998
	Mỹ	1998
	Châu á	1997
	Nhật Bản	1996
	Nam phi	1997
	Hà lan	1997
	Thụy sĩ	1997
Bông	Canada	1996
	Argentina	1998
	Úc	1996
	Nhật Bản	1997
	Mexico	1997
	Trung Quốc	1997
Khoai tây	Canada	1995
	Nhật Bản	1996
Củ cải dầu đường	Canada	2001
	Nhật Bản	1999
Cải dầu	Canada	1995
	Nhật Bản	1996
Hạt lanh	Canada	1996
Lúa mì	Canada	1999
Lúa	Canada	2002
Cà chua	Mexico	1995

3.1.3. Thông tin về một số vi sinh vật biến đổi gen

3.1.3.1. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng để làm thuốc bảo vệ thực vật

Bảng 12: Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng để làm thuốc bảo vệ thực vật

TT	Vi sinh vật	Gen được chuyển	Ứng dụng	GHI CHÚ
1	<i>Bacillus</i> sp.	CRYIA(B)	Diệt côn trùng	2 chủng này thuộc Viện CN Thực Phẩm, Hà Nội
2	<i>Escherichia coli</i> DH5- α	GEN MÃ HÓA CRYIDA	Mã hóa độc tố diệt côn trùng	
3	RALSTONIA SOLANACEARUM GM13172	A stable omega-kanamycin cassette within the <i>HrpO</i> gene	Sinh bacteriocin sử dụng trong phòng chống bệnh héo xanh cà chua	
4	RALSTONIA SOLANACEARUM YN5	pNP126 mang operon <i>lux</i> CDABE của <i>Vibrio fischeri</i> và một vùng promoter nhận được từ genomic ADN của <i>Burkholderia glumae</i>	Nghiên cứu cơ chế gây bệnh héo xanh và sự phát triển bệnh héo xanh của cà chua. Nghiên cứu chứng minh mức độ nhân lên của vi khuẩn trong rễ và cổ rễ sau khi vi khuẩn xâm nhập vào cây chủ và mức độ lan truyền của vi khuẩn lên các cành phía trên là các nhân tố quan trọng để xác định tính miễn cảm hay kháng của cà chua với bệnh héo xanh	

5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> strain BR11281, HERBASPIRILLUM SEROPE DICAE STRAIN BRT1335	Gen Cry của <i>Bacillus thuringiensis</i>	Phòng trừ sâu hại mía đường	
6	<i>C. xyli subsp. cynodontis</i>	Protein tinh thể độc tố trừ sâu (ICP) của <i>B. thuringiensis</i> supsp. <i>Kurstaki</i>	Phòng trừ sâu đục thân, một loại côn trùng hại ngô khó kiểm soát nhất từ trước đến nay	

3.1.3.2. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong xử lý môi trường

Bảng 13: Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong xử lý môi trường

TT	Vi sinh vật	Gen được chuyển	Ứng dụng
1	E. COLI	nhóm gen lai (<i>todC1</i> , <i>bhpA2</i> , <i>bhpA3</i> , <i>bhpa4</i>)	Phân huỷ trichloroethylene (TCE), một chất lỏng không màu được sử dụng làm dung môi để làm sạch kim loại. Tiếp xúc với TCE nồng độ cao sẽ gây ảnh hưởng đến hệ thần kinh, phá huỷ gan, phổi và làm thay đổi nhịp tim và có thể gây chết người

2	<i>P. cepacia</i> G4 5223 PR1	Gen toluen monooxygenaza	Phân huỷ TCE
3	<i>Anabaena</i> sp.	Gen <i>linA</i>	Phân huỷ sinh học lindane (γ -hexachlorocyclohexane), là một loại thuốc trừ sâu cho quả, rau và các cây lâm nghiệp. Tiếp xúc với lindane nồng độ cao có thể gây rối loạn đường huyết, đau đầu và thay đổi hàm lượng hormone giới tính
4	<i>Nostoc ellipsosporum</i>	<i>fcABC</i>	Phân huỷ sinh học halobenzoate
5	<i>E. coli</i> / <i>Alcaligenes</i> sp.	Các gen <i>cba</i>	Phân huỷ chlorobenzoate (hợp chất vòng thơm có hại cho môi trường và con người) thành protocatechuate và chlorodihydroxybenzoate không độc
6	<i>Comamonas testosteroni</i> VP44	Plasmid pE43 (mã hoá cho gen oxygenolytic ortho-dechlorination ohb) hoặc plasmid pPC3 (mã hoá cho gen hydrolytic para-dechlorination fcb)	Khử gốc Cl ⁻ và khoáng hoá toàn bộ monochlorobiphenyls thay thế vị trí ortho và para
7	<i>P. putida</i> PPO301	PRO301 PLASMID	Khoáng hoá phenoxyacetate và phân huỷ từng phần 2,4-D thành chloromaleate. Đây là hai loại thuốc diệt cỏ
8	<i>E. coli</i>	Gen toluen monooxygenaza	Phân huỷ TCE

	<i>P. putida</i>	Gen trao đổi phenol (<i>pheA</i> , <i>pheB</i> , <i>pheC</i> , <i>pheD</i> và <i>pheR</i>)	Phân huỷ TCE
9		Gen <i>atzA</i>	Khử gốc Cl ⁻ của atrazine thành hydroxyatrazine là một sản phẩm không độc với thực vật. Atrazine là một loại thuốc diệt cỏ, dạng bột màu trắng không mùi. Atrazine có ảnh hưởng xấu đến phụ nữ mang thai gây cho trẻ sơ sinh phát triển chậm hơn, đồng thời phá huỷ gan, thận và tim của trẻ

3.1.3.3. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

**Bảng 14: Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen
ứng dụng trong công nghệ thực phẩm**

TT	Vi sinh vật	Gen được chuyển	Ứng dụng	GHI CHÚ
1	<i>E. coli</i> BL21	GEN MÃ HÓA HMK KILLER TOXIN	Mã hóa kháng sinh chống nấm men làm hỏng thực phẩm	Chủng <i>E.coli</i> BL21 thuộc Viện CN Thực Phẩm, Hà Nội - Việt Nam
2	PICHIA PASTO RIS YEAST	cecropin D	Dùng làm thuốc kháng khuẩn	

	STRAIN GS115			
3	B. SUBTILI S 163	cluster of eleven genes (Nhóm 11 gen)	Sinh tổng hợp nisin, một chất có hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương gây bệnh và gây thối thực phẩm	

3.1.3.4. Nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong y tế

Bảng 15: Thông tin về nhóm vi sinh vật biến đổi gen ứng dụng trong y tế

TT	Vi sinh vật	Gen được chuyển	Ứng dụng
1	<i>Pseudomonas</i>	Tiếp hợp của hai operon <i>bhp</i> và <i>tod</i>	Phân huỷ chlorinated polychlorinated biphenyls (PCB)
2	<i>P. putida</i> F1	nhóm gen <i>bhp</i>	Phân huỷ PCB
3	<i>P. fluorescens</i> F113pcb	TNPCB	Phân huỷ PCB
4	<i>P. putida</i> KT2442 <i>Pseudomonas</i> sp. B13FR1	<i>bhp</i> -module	Phân huỷ PCB
5	<i>P.putida</i> / <i>Ralstonia eutropha</i>	Transposon TnPCB chứa các operon phân huỷ PCB/biphenyl (gồm các gene <i>bhpA</i> ₁ , <i>A</i> ₂ , <i>A</i> ₃ , <i>A</i> ₄ , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>K</i> , <i>H</i> , <i>J</i> , <i>I</i>	Phân huỷ sinh học PCBs

		ADN D	
6	<i>P. paucimobilis</i> IGP4	GEN BHPABC	Phân huỷ sinh học PCBs
7	Virus vắc xin loãng, chủng Ankara	TRÌNH TỰ MÃ HOÁ CHO IL-2 VÀ KHÁNG NGUYÊN MUC-1	Ung thư vú di căn
8	Virus vắc xin loãng, chủng Ankara	TRÌNH TỰ MÃ HOÁ CHO IL-2 VÀ KHÁNG NGUYÊN MUC-1	Ung thư biểu bì tế bào thận di căn
9	Canarypox- virus (ALVAC clone)	GEN ENV VÀ GAG CỦA VIRUS	Vắc xin chống lại virus bệnh bạch cầu mèo

		BỆNH BẠCH CẦU MÈO TYP A	
10	Canarypox- virus (ALVAC clone)	Gen <i>env</i> và <i>gag</i> của Virus bệnh bạch cầu mèo typ A	Vắc xin chống lại virus bệnh bạch cầu mèo
11	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> serotype Dublin ADN <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> serotype Typhimurium	BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA SALMONELL A ENTERICA BẰNG XOÁ HAI GEN ISSAC VÀ SSAT	Vắc xin chống lại <i>Salmonella dublin</i> và <i>Salmonella typhimurium</i>
12	AdenoVirus C type huyết thanh 5 bị xoá vùng E1 và E3	GEN MÃ HOÁ INTERLEUKI N 2 Ở	Ung thư khối rắn hay melanoma di căn

		NGƯỜI	
13	Virus mụn rộp mèo	GEN MÃ HOÁ CHO ENV GLYCOPROT EIN HOẶC GEN MÃ HOÁ CHO PROTEIN GAG CỦA VIRUS SUY GIẢM MIỄN DỊCH MÈO (FIV)	Phòng ngừa và/hoặc giảm nhiễm virus của mèo
14	PSEUDOMONAS	nhóm gen <i>bhp</i>	Phân hủy PCBs, một hỗn hợp các chất hoá học có hại đến thần kinh và miễn dịch ở người. PCBs được biết gây ung thư ở động vật
15	AdenoVirus type huyết thanh 5 của	<i>Gen ức chế khối u dạng đại p53</i>	Trị liệu gen bằng adenovirus tái tổ hợp trong chữa trị ung thư suy giảm p53. Adenovirus tái tổ hợp là một trong số

	người		các vector virus hiệu quả nhất để chuyển gen cả <i>in vitro</i> và <i>in vivo</i> do hiệu quả chuyển cao, phổ ký chủ rộng, khả năng nhiễm vào các tế bào không phân chia và tiềm năng tạo ra virus với nồng độ cao. ứng dụng của adenovirus tái tổ hợp không chỉ dừng ở trị liệu gen mà còn được sử dụng làm công cụ chuyển gen vào tế bào trong nghiên cứu cơ bản
16	Canarypox-virus (ALVAC clone)	<i>Gen haemagglutinin của virus cúm ngựa A2/ Kentucky/94 hoặc virus cúm ngựa A2-Newmarket/2/93</i>	Vắc xin chống lại virus cúm ngựa
17	<i>E. coli</i>	IFNG	Kháng virus, khối u và điều hoà đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.
18	<i>E.coli</i>	IL1B	Cảm ứng quá trình phân giải các hợp chất oxit nitric trong tụy tạng, trong các tế bào cơ trơn. Ngoài ra nó còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình viêm và đáp ứng khả năng miễn dịch và kích thích quá trình phục hồi của các vết thương
19	<i>E.coli</i>	IL8	Cảm ứng phản ứng gắn kết các tế bào bạch cầu trung tính với các tế bào nội mô. Nó tác động như một yếu tố hình thành các mạch của các khối u dạ dày.

20	<i>E.coli</i>	B2M	Sử dụng làm chỉ thị phân tử chuẩn đoán khối u và các bệnh thận
----	---------------	-----	--

3.1.4. Thông tin chung về động vật chuyển gen

3.1.4.1. Thông tin về cá chuyển gen

Người ta thấy rằng, các bước cơ bản trong việc chuyển gen vào cá và có được cá chuyển gen là phải phân lập và tinh sạch các gen cần thiết, biến đổi các gen đó hay các thành phần kiểm soát biểu hiện của các gen đó và chuyển các gen đã biến đổi vào kiểu gen của động vật chủ. Có hàng loạt các kỹ thuật chuyển gen khác nhau như vi tiêm, tiêm phôi, chuyển tế bào phôi, chuyển gen vào các mô cơ của cơ thể, và chuyển gen qua nhiễm sắc thể trung gian.

Bảng 16: Một số loài cá đã được chuyển gen

Loài	Kỹ thuật	Tác giả
Cá tráp vàng (<i>Sparus auratus</i>)	Vi tiêm gen đột biến gây bệnh ung thư β -galactosidase và melanoma	Cavari & CS, 1993
Cá chạch và cá diếc	Đưa gen hoocmon sinh trưởng của người được chuyển bằng metallothionein của chuột với hiệu suất 62,5%	Xie & CS, 1993
Cá hồi bạc	Thụ tinh cho trứng của cá thể cái trong tự nhiên với cá thể đực có chuyển gen	Devlin & CS, 1995
Cá nheo Mỹ (<i>Clarias gariepinus</i>) và cá vằn (<i>Danio rerio</i>)	Vi tiêm gen phức hợp prolactin I-Luciferase ở cá rô phi trong phôi một tế bào	Vockaert & CS, 1995
Cá Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Vi tiêm ADN plasmid chứa metallothionein cá hồi trắng, một vùng khởi động, tiếp đó là gen acetyl tranferase của vi khuẩn ADN được hợp nhất vào trong nhiễm sắc thể và dòng <i>Medaka</i> mới với kiểu hình được tạo nên độc nhất	Kinoshita & CS, 1996

Chuyển gen ở cá dễ dàng hơn các loài động vật khác vì chúng có một lượng lớn trứng ở mọi giai đoạn phát triển, thời gian sống của một thế hệ ngắn và tần số đẻ trứng khá

cao, sự thụ tinh được tiến hành ngoài cơ thể và không cần có những thao tác phức tạp như trong trường hợp động vật có vú, phôi thai cũng dễ dàng ươm nuôi. Ngoài ra, sự hoà nhập ADN vào bộ gen của vật chủ luôn đạt tỷ lệ cao.

◆ Mức độ ảnh hưởng của cá chuyển gen đối với sức khoẻ con người:

Thật khó để quản lý tính an toàn của cá chuyển gen đối với người tiêu thụ bởi vì một số nghiên cứu đã được thực hiện, nhưng có những lý do khiến người ta tin rằng: ăn cá chuyển gen có thể dẫn đến những ảnh hưởng có hại cho sức khoẻ. Như các sinh vật biến đổi di truyền khác, cá chuyển gen có thể chứa các protein mới mà có thể liên quan đến một vài phản ứng dị ứng. Kỹ thuật di truyền vốn là mơ hồ, việc chuyển gen là ngẫu nhiên và các gen được chuyển có thể phá vỡ hoặc khuếch đại các chức năng khác trong cá, có khả năng làm cho hàm lượng dinh dưỡng của cá giảm hoặc thậm chí gây độc.

Các trình tự không biết trước của việc chuyển gen được gọi là các ảnh hưởng thứ cấp. Cơ quan quản lý Dược phẩm và thực phẩm Mỹ (FDA) đã xác định rằng một gen chuyển không thể “turned off” một lần, khi nó được chuyển vào một sinh vật nào đó thì có thể dẫn tới sự biểu hiện không kiểm soát được. Sự biểu hiện quá mức của một protein dẫn đến mức độ biểu hiện của protein đó cao hơn. Như độc tính đối với con người có thể được xác định bởi tính tự nhiên hoặc số lượng của một cơ chất, nồng độ protein cao hơn có thể gây độc đối với con người. Phụ thuộc vào vị trí gen chuyển vào, chúng cũng có thể có ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen khác. Hơn nữa, tính di truyền của hoocmon sinh trưởng mới được chuyển vào cá hồi có thể làm tăng sản phẩm của các hợp chất khác như insulin trong cá. Tất cả những khả năng có thể bổ sung tới nồng độ cao này là không chắc chắn về mức độ an toàn thực phẩm của cá chuyển gen.

Ngoài các gen quy định hoocmon sinh trưởng đưa vào cá, các nhà khoa học cũng thí nghiệm bằng cách tiêm hoocmon sinh trưởng (rBGH) vào cá tilapia, hoocmon này có nguồn từ bò. Hiện nay, rBGH được sử dụng trên bò cái ở Mỹ, để làm tăng sản lượng sữa, nhưng việc sử dụng nó đã bị phê bình và ngăn cấm bởi nhiều quốc gia khác nhau, do liên quan đến hoocmon mà có những ảnh hưởng bất lợi lên bò và dẫn đến hàm lượng IGF-1 tăng, một cơ chất liên quan đến bệnh ung thư ở người. Trong khi người tiêu thụ từng bước loại bỏ rBGH được đưa vào bò cái, điều này không đúng đối với trường hợp tilapia. Có một bằng chứng liên quan đến ứng dụng của các hoocmon sinh trưởng này có thể dẫn đến ảnh hưởng có hại cho con người. Cần tiến hành nhiều

thử nghiệm về tính an toàn của những loại thực phẩm mới này trước khi có báo cáo chính thức.

◆ Vấn đề an toàn thực phẩm

Cá là một nguồn thực phẩm chính đối với chế độ ăn của con người. Vì vậy, cần có thử nghiệm để đánh giá các rủi ro có thể (và các lợi ích) của cá chuyển gen nếu cá được đưa vào sử dụng như là một nguồn thực phẩm. Điều này liên quan đến một số vấn đề về sức khỏe con người, bao gồm một số lợi ích đáng chú ý mà có thể có trong cá chuyển gen. Việc thảo luận này dành sự chú ý đặc biệt đến những rủi ro vốn có của các quần thể cá (ví dụ các hợp chất độc, các chất gây dị ứng và các hoocmon) có thể có nhiều phức hợp hơn trong nuôi trồng thủy sản cá chuyển gen.

Một số loài cá chứa độc tính mà làm nguy hiểm tới người tiêu dùng - đặc biệt nếu những hợp chất này có độ độc tính tăng. Một số chất độc như thủy ngân, được tìm thấy ở một số loài cá bình thường, tôm, cua, trai, sò, được hấp thụ từ môi trường (EPA, 2002). Các nhà khoa học đã lo lắng rằng gen chuyển có thể vô tình gây ra tính kháng độc ở cá chuyển gen, vì vậy cho phép hàm lượng độc tích hợp trong mô của chúng cao hơn. Ngược lại, điều này có thể gây nguy hiểm đến con người và các loài động vật ăn cá chuyển gen. Những chất độc khác như tetrodotoxin đã tìm thấy ở một số loài cá puffer, chất độc này có trong thực phẩm mà cá ăn phải (U.K.HGMP Resource centre, 2002). Có một số lo lắng rằng kỹ thuật di truyền có thể tạo ra loài cá mà nó có độc tính cao, dẫn đến những ảnh hưởng gián tiếp trong gen chuyển qua việc hấp thụ và trao đổi các chất độc (Kapuscinski và Hallerman 1994).

Mối quan tâm đáng chú ý khác đó là gen chuyển có thể làm cho cá hoặc tôm, cua, trai, sò chuyển gen tạo ra một chất độc mới và khi ấy sẽ gây nguy hiểm cho con người hoặc các động vật ăn các loài chuyển gen này. Tuy nhiên, một số nhà khoa học tranh cãi rằng cá, tôm, cua, trai, sò chuyển gen nhìn chung không tạo ra các chất độc trừ khi sử dụng kỹ thuật di truyền đối với các gen tạo ra các protein độc (Berkowitz và Krypsin- Sorensen 1994).

Các chất gây dị ứng

Nhiều người dị ứng với cá và các sinh vật dưới nước khác. Mặc dù việc nghiên cứu các chất gây dị ứng ở thực phẩm đã hạn chế, các nhà khoa học biết rằng các phản ứng dị ứng là sự phản ứng lại với các protein trong thực phẩm và mỗi người khác nhau có thể dị ứng với các loại protein khác nhau. Một số các sinh vật dưới nước như tôm, cua, động vật thân mềm và một số ít cá gây ra một số phản ứng dị ứng ở những cá thể

đề mắc phải. Chưa có sự hiểu biết đầy đủ về protein (hoặc một phần protein) gây dị ứng cho người và tác động trở lại.

Có thể nói rằng quá trình các sinh vật dưới nước biến đổi di truyền có thể tăng một cách ngẫu nhiên khả năng gây dị ứng của sinh vật đó. Khi chuyển gen nào đó vào cá thì cá này có thể tạo ra một protein mà không dự báo trước, hoặc thay đổi thành phần của protein gây ra phản ứng dị ứng.

◆ Các hoocmon

Thực vật và động vật tạo ra nhiều loại hoocmon khác nhau, mỗi loại đóng một vai trò quan trọng trong việc điều khiển sinh lý của sinh vật. Hầu hết các hoocmon đều không hoạt động độc lập. Ví dụ ở cá, tăng hoocmon sinh trưởng sẽ làm tăng mức độ các promoter sinh trưởng khác (Moriyama 1995). Các hoocmon được tiết ra bởi các động vật có xương sống khác, như cá, về mặt sinh học không giống sự hoạt động của người bởi vì chúng không giống với các hoocmon của người mà liên kết với các receptor hoocmon sinh trưởng trên các tế bào người. Vào những năm 80, cơ quan Dược phẩm và thực phẩm Mỹ (FDA) đã đánh giá vấn đề này và thấy rằng: không có rủi ro nào liên quan đến sức khỏe của người tiêu dùng khi sử dụng kết hợp hoocmon sinh trưởng bò vào cá.

3.1.4.2. Thông tin về bò chuyển gen

Trong những cố gắng không ngừng của con người để nâng cao sức khỏe, sự tiến bộ của nền khoa học hiện đại bao gồm công nghệ gen và công nghệ chuyển gen đã phát hiện ra những liệu pháp gen mới dựa trên việc sản xuất protein tái tổ hợp có trong sữa của bò chuyển gen. Phương pháp này cung cấp một nguồn protein an toàn, có giá trị cao và không thể sản xuất bằng các phương pháp khác.

Năm 1998 có khoảng dưới 1% dược phẩm là protein được tổng hợp tái tổ hợp nhưng trị giá của nó đạt tới 12 tỷ USD. Người ta dự tính rằng chỉ cần 600 con bò chuyển gen là có thể cung cấp đủ nhu cầu của cả thế giới về một loại dược phẩm là một loại protein nào đó (ví dụ human serum albumin cho điều trị bỏng).

Bò cái chuyển gen Pampa Mansa có thể là chìa khóa làm giảm giá thành hoocmon sinh trưởng của người, nó được sử dụng để điều trị cho hàng ngàn trẻ em có vấn đề về sinh trưởng. Bò cái biến đổi gen có tên là Jersey tạo ra rất nhiều hoocmon sinh trưởng trong sữa của nó, 15 con bò cái này có thể đáp ứng nhu cầu của thế giới.

Trước kia, các hoocmon sinh trưởng được khai thác từ các tử thi, còn bây giờ được khai thác từ các vi khuẩn biến đổi gen. Theo cách này chất lượng hoocmon an

toàn hơn, nhưng giá thành cao. Đội nghiên cứu của Daniel Salamone trường Đại học Buenos Anos ở Argentina đã thêm gen của người vào các tế bào của bò cái đang sinh trưởng trong một đĩa thức ăn nhằm mục đích tạo ra một nguồn thay thế mới. Đến tuổi trưởng thành Pampa Mansa tạo ra 5 gam hoocmon trong 1lít sữa, chiếm 10% thành phần protein trong sữa. Vì vậy tạo ra ít nhất 4 kg trong mỗi năm, gấp hơn 4 lần cách lên men vi khuẩn.

Trong nghiên cứu về nông nghiệp của trường đại học Ruakura ở Hamilton đã có những thử nghiệm về bò sữa biến đổi di truyền. Có 3 thử nghiệm riêng biệt sau:

- Đưa thêm một bản sao của gen sản xuất casein để làm thay đổi thành phần protein chứa trong sữa.
- Làm đứt gãy gen mã hoá β -lactoglobulin để làm thay đổi thành phần của sữa. Gen β lactoglobulin chịu trách nhiệm trong quá trình sản xuất protein, protein này gây ra các dị ứng lactose ở sữa bò.
- Đưa một gen của người vào, gen này tạo ra protein myelin trong sữa bò. Protein này được tách chiết từ sữa bò, sau đó tinh sạch. Protein myelin có khả năng điều trị bệnh xơ cứng. Không phải tất cả các loại sữa đều chứa protein này, những vật nuôi đặc biệt sẽ được sử dụng để tạo ra protein riêng biệt.

Bò sữa cao sản Friesian được thụ tinh nhân tạo với tinh trùng được bảo quản. Kết quả là phôi được hình thành và chuyển vào những con mẹ khác mang thai hộ trong khoảng 90 ngày. Sau đó phôi bị làm tiêu và tách lấy các tế bào phi sợi. Các dòng tế bào nguyên thủy, các tế bào chứa gen đã biến đổi và con cháu của chúng được phát triển liên tục để kiểm tra sức sống của các tế bào và sự ổn định của vật liệu di truyền. Tương tự các dòng tế bào bắt nguồn từ những con bò trưởng thành bằng cách chọn lọc các mẫu da từ các động vật nuôi. Giới tính của các dòng tế bào được xác định trước khi biến đổi di truyền, vì vậy 75% động vật là con cái. Còn lại 25% phải là con đực để phục vụ cho mục đích chọn giống.

Ngày nay, sữa bò có mặt trong nhiều thực phẩm quan trọng được dùng không chỉ ở dạng tự nhiên mà còn được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm chế biến từ sữa. Tăng sản lượng phomat là chìa khoá giải quyết những lo lắng của các nhà sản xuất phomat trên thế giới. Để giải quyết những lo lắng này, các nhà khoa học tại New Zealand đã tạo ra những con bò cái biến đổi gen để sản xuất sữa có hàm lượng protein cao cho ngành công nghiệp phomat. Những con bò cái này có các bản sao của các gen mã hoá cho 2 loại protein là β -casein và κ -

casein. Kết quả là sữa của chúng chứa trên 20% β -casein và một lượng κ -casein gấp đôi lượng κ -casein truyền thống.

Vào tháng 2/2003, một nhóm các nhà nghiên cứu của Australia và New Zealand đã thông báo là đã tạo ra bò chuyển gen có hàm lượng β -casein và κ -casein trong sữa cao. Hai loại protein này đóng vai trò quan trọng trong việc xác định đặc tính tạo phomat trong sữa.

Bò chuyển gen có chứa nhiều bản sao của các gen β -casein và κ -casein được tạo ra nhờ các kỹ thuật chuyển gen và nhân dòng bằng cách truyền nhân. Một trong những thuận lợi của truyền nhân là giới tính của thế hệ con cháu chuyển gen được xác định trước. Trong trường hợp này, các tế bào nguyên bào sợi của bò cái được đồng chuyển với các đoạn ADN mã hoá cho các gen β -casein và κ -casein để chắc chắn tạo ra những con bò chuyển gen. Toàn bộ 9% (11/126) các phôi đã được chuyển bắt nguồn từ các tế bào chuyển gen kép tạo ra những con bò cái có thể sống được. 20% (7/35) các nguyên bào sợi của bò chưa được chuyển nhiễm có thể sống.

Nhóm nghiên cứu của Laible đã tạo ra được một số lượng lớn các dòng tế bào chuyển gen, mỗi tế bào có chứa 39 bản sao của các gen tạo casein. Những dòng tế bào này được đưa vào trong trứng của bò cái, và sau đó phôi đã được nhân bản, được cấy vào trong bò cái. Kết quả là trong số 10 con bê được sinh ra, có 9 con cho sữa với hàm lượng casein cao hơn.

Nhưng sự nghi ngờ và mối quan ngại của công chúng về tính an toàn khi sử dụng những thực phẩm được sản xuất bằng công nghệ gen động vật rõ ràng là một rào cản cho sự tăng trưởng của sản phẩm trong thị trường đầy tiềm năng hiện nay.

3.1.4.3. Thông tin về lợn chuyển gen

♦ **Phương pháp chuyển gen:** Những thành công đầu tiên về nhân dòng vô tính ở lợn được báo cáo đầu năm 1989. Prather đã sử dụng phôi bào từ bốn giai đoạn phôi của tế bào và nhân *in vitro* bắt nguồn từ pha phân bào II (pha giữa II) của tế bào trứng. Tổng số đã có 88 phôi truyền nhân được chuyển vào lợn cái và một con lợn con được sinh ra.

Tiếp theo sử dụng các tế bào trứng chín được lấy trực tiếp từ lợn cái tốt hơn là nuôi cấy *in vitro* các tế bào trứng non. Các tế bào trứng chín cần một số lượng lớn và nuôi cấy *in vivo* các tế bào trứng chín là rất đắt. Vì vậy có nhiều sự lựa chọn sử dụng các tế bào trứng chín *in vitro*. Các tế bào trứng chưa chín từ các buồng trứng được lấy

từ các lò mổ và được trưởng thành trong điều kiện *in vitro*, tiếp theo nuôi cấy tế bào cho, nuôi cấy *in vitro* các phôi và chuyển chúng vào thể nhận là lợn cái.

Tái tổ hợp các thể đồng hợp tử được sử dụng để phá vỡ trình tự gen α -1,3-*galactosyltransferase* (GGTA1) trong nguyên bào sợi của lợn con. Nhân của nguyên bào sợi gốc được chuyển vào các tế bào trứng chín không nhân nuôi cấy *in vitro*.

Kỹ thuật truyền nhân soma ở lợn, bao gồm việc nhân *in vitro* các tế bào trứng trưởng thành, tách và xử lý các tế bào cho, phóng xạ nhân tạo các tế bào trứng đã được khôi phục, nuôi cấy phôi và chuyển phôi. Vi tiêm ADN tiền nhân là phương pháp được tin tưởng nhất để tạo ra lợn chuyển gen.

Nhân dòng vô tính bằng cách cấy nhân tế bào soma đã thành công nhờ sự dung hợp tế bào cho với nhân tế bào cho đã được tách và tiêm vào tế bào trứng không nhân. Hiệu quả của việc nhân dòng có thể bị giảm bởi tỷ lệ dung hợp tế bào thấp và đặc biệt là kỹ thuật thao tác vi tiêm và kỹ thuật phân tách nhân rất cần sự chính xác.

Với phương pháp tiêm trực tiếp tế bào nguyên vẹn vào tế bào trứng không nhân, các nhà nghiên cứu đã tạo ra được những con lợn vô tính từ các tế bào nguyên bào sợi của con lợn cái chuyển gen trưởng thành.

Bảng 17: Thông tin về một số gen đã được chuyển vào lợn

Các gen (nguồn gốc) và hooc mon sinh trưởng	Mục đích
Gen phytaza: <i>Escherichia coli</i>	Giảm photpho trong phân lợn
Gen chuyển <i>cSKI</i> : gà (virus gây ung thư mô ở chuột)	Thịt nạc hơn
Hoocmon sinh trưởng: bò (methalioncin: chuột)	Sinh trưởng nhanh
Hoocmon sinh trưởng: bò (methalioncin: chuột) (Albumin: chuột)	Sinh trưởng nhanh
Hoocmon sinh trưởng: chuột đồng (virus gây ung thư bạch cầu : chuột)	Sinh trưởng nhanh
Hoocmon sinh trưởng: lợn (methalioncin: người)	Sinh trưởng nhanh/thịt nạc hơn
Nhân tố sinh trưởng-Insulin: (methalioncin: chuột) α -actin của xương: chim	Thịt nạc hơn
Hoocmon sinh trưởng: Người, (methalioncin: chuột)	Phát triển công nghệ

♦ **Mục đích chuyển gen:** Cơ quan nội tạng của lợn được đánh giá là nguồn tốt nhất để thay thế các cơ quan nội tạng của người, bởi vì chúng có kích thước tương tự với cơ quan nội tạng của người.

Những khó khăn trong chuyển gen lợn để làm cơ quan thay thế cho người: Tuy nhiên, có một vài vấn đề kỹ thuật cản trở việc sử dụng cơ quan lợn, đó là:

- Hệ thống miễn dịch của người nhận ra các cơ quan của lợn như là vật lạ.

Gần đây, những vấn đề này đã được giải quyết bằng việc biến đổi gen ở lợn để thay đổi những kháng nguyên biểu hiện trên bề mặt tế bào. Mục đích là để đánh lừa hệ thống miễn dịch của người, giúp hệ thống miễn dịch ở người tin tưởng rằng các cơ quan lợn tạo ra từ các tế bào người.

Mặt khác, kỹ thuật loại bỏ gen được sử dụng trong lợn để loại bỏ những gen mã hoá các kháng nguyên mà kích thích đáp ứng miễn dịch cũng giúp cải thiện điều cản trở trên.

- Một cản trở nữa đối với cấy ghép cơ quan từ lợn vào người là một loại phân tử đường đặc biệt - Gal- α -1,3-Gal - mà được gắn với protein trên bề mặt tế bào lợn nhưng không có ở người. Vì vậy phải làm giảm số lượng các phân tử đường này bằng cách ức chế enzym tạo ra nó (enzym α -1,3- *galactosyltransferase* chỉ có trong lợn) hoặc thêm các enzym để biến đổi nó. Một nhóm các nhà khoa học mà dẫn đầu là Randall Prather của trường Đại học Missouri ở Columbia đã tạo ra bốn con lợn vô tính mà trong đó bản sao của gen tạo đường bị loại bỏ (Cơ thể nhận hai bản sao của gen, một từ bố và một từ mẹ). Bằng việc chọn giống những con lợn thí nghiệm, tất cả nhóm các nhà khoa học đều hy vọng tạo ra những con lợn thiếu cả hai gen tạo đường. Họ mong đợi các bộ phận của những con lợn biến đổi gen này có thể được cấy ghép vào con người mà không có những vấn đề về sự loại bỏ các mô.

3.1.4.4. Động vật chuyển gen và ứng dụng của chúng trong dược phẩm

♦ **Bảng 18: Các loại dược phẩm được sử dụng gần đây có nguồn gốc từ động vật chuyển gen**

Động vật GM	Dược phẩm/protein	SỬ DỤNG
MÁU VÀ HỆ TUẦN HOÀN		
Lợn	Hemoglobin của người	Gen được chuyển để tạo hemoglobin của người, có khả năng vận chuyển oxy như bình thường.
Cừu, Lợn, Bò	Yếu tố chống đông máu VIII, IX.	Điều trị bệnh ưa chảy máu và giảm nguy cơ phản ứng truyền máu.
Cừu, Bò	Fibrinogen	Điều trị vết thương
Bò	Albumin huyết thanh người	Duy trì thể tích máu và chống sốc khi mất máu
Dê	Chất chống đông máu nhóm III	Protein chống đông máu nhóm III xuất hiện thường xuyên trong cơ thể và nó có vai trò đông máu. Công ty Công nghệ Sinh học Massachusess đã tạo ra dê chuyển gen này, mỗi con hàng năm tạo ra 500-800 lít sữa, mỗi lít chứa 28g protein.
Cừu	Alpha-1-anti trypsin	Thiếu hụt dẫn tới hội chứng “Emphysema”. Protein này giúp tăng quá trình vận chuyển qua màng của dưỡng khí cũng như chất thải. Các nhà KH ở Scottlen đã tạo ra cừu biến đổi gen sản xuất >35g alpha-1-antitrypsin trong 1 lít sữa=1/5 nhu cầu điều trị cho 1 bệnh nhân/năm. Tuy nhiên, vào tháng 6 năm 2003, công ty này đã phải từ bỏ công trình do chi phí quá tốn kém cho việc tinh chế protein từ sữa cừu.
Cừu, lợn, dê	Yếu tố hoạt hoá plasminogen của mô bào	Enzyme chống đông vón sử dụng điều trị một số bệnh tim mạch, nghẽn mạch

Điều trị và phòng chống lây nhiễm		
Dê	Pro542	Điều trị HIV
Dê, cừu	Yếu tố vận chuyển xuyên màng	
Bò	Alpha-lactalbumin	Chống nhiễm trùng
Bò	Colagen I và II	Sửa chữa mô bào, điều trị thấp khớp
KHÁNG THỂ		
Gà	Kháng thể, Protein máu, dinh dưỡng	Trứng với hàm lượng dinh dưỡng phù hợp với nhu cầu con người
Chuột	Kháng thể người	Kháng thể động vật có phản ứng quá mẫn cảm nhưng kháng thể người được tổng hợp từ chuột thì không.
Gà, bò, dê	Kháng thể đơn dòng	Các loại vaccine được tạo ra như vaccine viêm gan B.
CÁC LOẠI KHÁC		
Dê	Protein chống bệnh sốt rét	Năm 1998, 1 báo cáo cho rằng, sữa dê có chứa 1 loại protein giống với protein của ký sinh trùng sốt rét, vì vậy sữa này có thể được dùng như một loại vaccine chống bệnh sốt rét.
Thỏ	Alpha-glucosidase	Chống bệnh Pompe, bệnh rối loạn tế bào gan-> không có khả năng chuyển hoá glycogen -> đái đường.
Bò	Lactoferrin	loại protein này giúp con vật non hấp thụ Fe^{2+} , có tác dụng chống nhiễm khuẩn, chống thiếu máu, chống viêm khớp.
Dê	Acide Glutamic decarboxylase	Điều trị tiểu đường nhóm 1

♦ **Bảng 19: Giá một số sản phẩm thuốc được tạo ra bởi công ty ‘Animal Pharming’**

THUỐC	Động vật	Giá con/năm
AAT (α -1 antitrypsin, thiếu hụt di truyền dẫn tới hội chứng emphysema)	Cừu	15.000 USD
TPA(tissue Plasminogen activator, điều trị đông máu)	Dê	75.000 USD
Yếu tố VIII (yếu tố đông máu, điều trị ưa chảy máu XI)	Cừu	37.000 USD
Hemoglobin (máu thay thế)	Lợn	3.000 USD
Lactoferrin (chất thay thế bổ sung cho trẻ nhỏ)	Bò	20.000 USD
CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductant regulator, điều trị nang xơ.	Cừu, chuột, dê	75.000 USD
Human Protein C, chống đông máu, điều trị đông máu	Lợn	1.000.000 USD

3.1.4.5. Thông tin tóm tắt về động vật chuyển gen trên thế giới

Bảng 20: Danh sách các loài động vật chuyển gen trên thế giới

Loài	Gen chuyển vào	Tính trạng
Dê	Antithrombin III	Giảm lượng máu cần thiết trong khi phẫu thuật
	Protein mạng nhện	Làm nguyên liệu cung cấp cho công nghiệp và dược
	Điều trị xơ nang và khí thũng	Chất ức chế Proteaza và antithrombin III
	Điều trị bệnh do virus	7 kháng thể khác nhau
	Kháng thể đơn clon	Sản xuất vacxin
	Lysostaphin	Chống lại chứng viêm vú
	Nhân tố VIII, và nhân tố IX	Điều trị bệnh ưa chảy máu
	Protein C ở người	Điều trị chứng huyết khối
	Chất chống đông máu 3	Điều trị chứng huyết khối
	Acid glutamic decarboxylase	Điều trị bệnh đái tháo đường type 1
	Pro 542	Hỗ trợ điều trị HIV
	Stearoyl –CoA	Tăng thành phần acid béo trong sữa
	Lysozyme	Tăng thành phần acid béo trong sữa
Cừu	Hoocmon sinh trưởng	Sinh trưởng nhanh(CSIRO)
	IGF-1 với promoter là keratin	Tăng sản lượng lông

	Kháng bệnh	Kháng thể đơn dòng
	Điều trị đa xơ cứng	Antitrypin, nhân tố IX,VIII,Fi
	Gen sản xuất keratin trong nang lông	Thay đổi đặc tính lông như độ bóng và độ dài của lông,
	CFTR	Điều trị bệnh xơ nang
	Anpha-1-antitrypsin	Điều trị xơ nang và khí thũng
	Mô hoạt hoá Plasminogen	Điều trị chứng huyết khối
	Nhân tố VIII, IX	Điều trị bệnh ưa chảy máu
	Fibrinogen	Để chữa vết thương
	Insullin (type I)	Tăng sản lượng lông (SARDI)
	Màng bao virus Visna	Giảm bệnh lý của bệnh viêm não,viêm phổi, viêm khớp (Clement, 1994)
	PrP	Chuyển gen làm giảm tính nhạy cảm của bọt biển nhằm chữa bệnh não (Denning, 2001)
	Myostatin	Xác định phạm vi ảnh hưởng của những tính trạng bất biến (GMD 99052)
Bò	Lactoferrin	Làm kháng sinh tự nhiên và sử dụng trong phẫu thuật hình vành
	Lysostaphin	Kháng khuẩn để ngăn ngừa chứng viêm vú ở bò
	Alpha-lactalbumin	Chống nhiễm trùng
	Nhân tố VIII	Điều trị bệnh ưa chảy máu
	Fibrinogen	Để chữa vết thương
	Collagen I,Collagen II	Thay thế mô , điều trị bệnh viêm khớp mãn tính tăng dần
	Lactoferrin	Điều trị tác động nhẹ của GI, điều trị lây nhiễm chứng viêm khớp
	Kháng thể đơn clon	Sản xuất những vacxin khác
	Huyết thanh Albumin người	Sản xuất máu
	Gen huyết thanh người	Sản xuất kháng thể
	Casein	Tăng chất lượng sữa (dairy CRC)
	PrP	Giảm khả năng mắc bệnh não ở bò (Denning & CS., 2001)
	Chưa biết	Tăng khả năng kháng bệnh trùng mũi khoan
	Chưa biết	Tăng chất lượng sữa và giảm tỷ lệ dị ứng ở người uống sữa
	Lactoglobulin	Tăng sự sản xuất protein trong sữa
	Lactaza ruột	Tăng lượng đường trong sữa

Lợn	Hoocmon sinh trưởng lợn dưới sự điều khiển của metallathionine	Sinh trưởng nhanh
	Insulin (type I)	Sinh trưởng nhanh
	a-lactalbumin bò	Sinh trưởng nhanh
	Kháng thể đơn dòng	Chống viêm dạ dày ruột
	CoA	Tăng lượng lipid
	Phytase của <i>E.coli</i>	Tận dụng lượng Phytase của lợn vì vậy không lãng phí Phospho
	Chưa biết	Tăng khả năng kháng bệnh
	a (1,3) galactosyltransferase	Tạo kháng nguyên bề mặt
	Hemoglobin người	Sản xuất máu
	Nhân tố VIII . IX	Chữa bệnh máu khó đông
	Mô hoạt hoá Plasminogen	Điều trị chứng huyết khối
	Gen GnT-III, gen lợn đã đột biến	Làm mô hình sắc tố viêm võng mạc
	CD55,CD59	Lấy cơ quan để cấy ghép khác loài
	Nhân tố VIII,hacmoglobin	Điều trị các rối loạn về máu
Chim cút	Gen marker ở vi khuẩn	Phát triển kỹ thuật
Gà	Kháng thể đơn dòng	Điều trị bệnh viêm gan và một số bệnh ung thư ở người. Sản xuất vacxin
	Vỏ bao virus <i>Leucosis</i> lấy từ chim	Tăng khả năng kháng bệnh
	Beta –lactamase của vi khuẩn	Sản xuất protein ngoại sinh trong lòng trắng trứng
Chuột	Đưa Lysostaphin vào trong tuyến vú	Tránh được bệnh khuẩn tụ cầu
	Stearoyl-CoA desaturase	Tăng thành phần chất béo trong sữa và cân đối hàm lượng acid béo
	<i>Clostridium thermocellum</i> endoglucanase E	Tăng khả năng tiêu hoá các mảnh tế bào động vật
	Gen Isocitrate lyasae và malate synthase từ <i>E.coli</i>	Đưa chu trình Glyoxylate vào động vật có vú cho phép tổng hợp Gluco từ acetate
Thỏ	Hoocmon sinh trưởng	Sinh trưởng nhanh
	Kháng thể đơn dòng	Kháng bệnh
	Glucosidase ở người	Điều trị bệnh Pompe
	Calcitonin ở cá hồi	Điều trị bệnh loãng xương
	Erythropoieten(EPO) ở người	Điều trị bệnh Paget
	Dismutase peroxit ngoại bào, interleukin ở người	Chữa bệnh thiếu máu, ung thư máu

Cá trắm cỏ	Gen marker	Không rõ
Cá chép	Hoocmon sinh trưởng	Sinh trưởng nhanh
Cá vàng	Chuỗi peptid chống đông	Chống đông máu
Cá Wuchang	Ceiopin	Sản xuất Ceiopin
Cá chạch cát lớn	Interferon	Sản xuất Interferon
Cá chó miền bắc	Phytase	Sản xuất Phytase
Cá hồi đốm đen	Nhân tố VII	Không rõ
Cá hồi bạc	Hoocmon sinh trưởng của cá hồi trắng	Sinh trưởng nhanh
Cá hồi đại dương	Hoocmon sinh trưởng của cá hồi trắng, promoter AFP của cá nheo	Sinh trưởng nhanh
Cá hồi chấm hồng	Gen kháng GnRH	Kháng GnRH
Cá trê	Cecropin peptid	Tăng sự kháng bệnh
Cá tráp vàng	Gen đột biến gây bệnh ung thư galactosidase và melanoma	Không rõ
Cá nheo Mỹ	Phức hợp I-Luciferase ở cá rô phi	Không rõ
Cá Mekada	Plasmid chứa gen metallothionein cá hồi trắng, gen acetyltransferase của vi khuẩn	Không rõ
Cá hồng	Hóc môn sinh trưởng của cá trắm cỏ	Sinh trưởng nhanh
Cá rô phi Hornorum	Hoocmon sinh trưởng của cá hồi đỏ	Sinh trưởng nhanh
Cá rô phi sông Nin	Hoocmon sinh trưởng của người , promoter là Metallothionein-I của chuột	Sinh trưởng nhanh
Cá vền biển bạc	Hoocmon sinh trưởng của cá hồi đốm đen, promoter # - actin	Sinh trưởng nhanh
Bào ngư Nhật Bản	Hoocmon sinh trưởng của cá hồi trắng, promoter AFP của cá nheo	Sinh trưởng nhanh

3.1.5. Thông tin về các gen được chuyển vào trong một số cây trồng

Nhiều cây được chuyển gen để cải tiến tính trạng và chất lượng như:

- Chống chịu thuốc trừ cỏ
- Chống chịu côn trùng
- Chống chịu bệnh
- Tăng thành phần dinh dưỡng
- Tăng thời gian bảo quản

Khả năng chống chịu thuốc trừ cỏ đã trở thành đặc điểm quan trọng nhất sau đó là khả năng chống lại côn trùng. Các giống cây trồng biến đổi gen chống chịu thuốc trừ cỏ phổ biến nhất là chống chịu glyphosate và glufosinate. Hai loại chất thuốc trừ cỏ này rất hữu ích trong việc kiểm soát cỏ dại và ít ảnh hưởng trực tiếp lên vật nuôi cũng như không tồn tại lâu dài, chúng có hiệu quả cao nhất và an toàn nhất trong số những hoá chất dùng trong nông nghiệp. Đặc tính chống chịu thuốc trừ cỏ thường được chuyển vào các cây trồng như đậu tương, cải dầu và một số giống ngô. Khả năng chống lại côn trùng nhờ độc tố của vi khuẩn *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) là một đặc tính đã được chuyển vào nhiều loại cây trồng như ngô, bông, khoai tây... Ví dụ dòng ngô chuyển gen MON80100 được biến đổi di truyền để kháng sâu đục thân ngô Châu Âu (ECB) bằng cách tạo ra thuốc trừ sâu của chính nó. Dòng ngô này được phát triển nhờ chuyển gen *CryIA(b)* mà đã được phân lập từ vi khuẩn đất *Bt* vào dòng ngô (Hi-II x FRB73) nhờ phương pháp biến nạp bằng gia tốc hạt (súng bắn gen). Hay các dòng bông 31807 và 31808 đã được biến đổi di truyền để kháng lại sự tấn công của các loại côn trùng mà chủ yếu là côn trùng thuộc bộ cánh vảy ở bông và chống chịu thuốc trừ cỏ thuộc họ Oxynil gồm có bromoxynil và ioxynil. Những dòng bông chuyển gen này chứa gen *bxn* – là gen chống chịu oxynil và gen *CryIA(c)* từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* mã hoá cho protein *CryIA(c)* kiểm soát côn trùng. Những gen này được đưa vào hệ gen của bông thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*.

BẢNG 21: MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI GEN ĐANG ĐƯỢC THƯƠNG MẠI HOÁ

Cây trồng	Đặc tính
Cải dầu	Chống chịu chất diệt cỏ
Cải dầu	Hàm lượng Laurate cao
Ngô	Kháng côn trùng
Ngô	Chống chịu chất diệt cỏ

Bông	Chống chịu chất diệt cỏ
Bông	Kháng côn trùng
Đu đủ	Kháng virus
Đậu tương	Chống chịu chất diệt cỏ
Đậu tương	Hàm lượng acid oleic cao
Bí	Kháng virus
Khoai tây	Kháng sâu bệnh/chịu thuốc diệt cỏ
Cà chua	Chín chậm
Lúa	Kháng côn trùng
Lúa	Chống chịu chất diệt cỏ
Lúa	Tăng hàm lượng dinh dưỡng

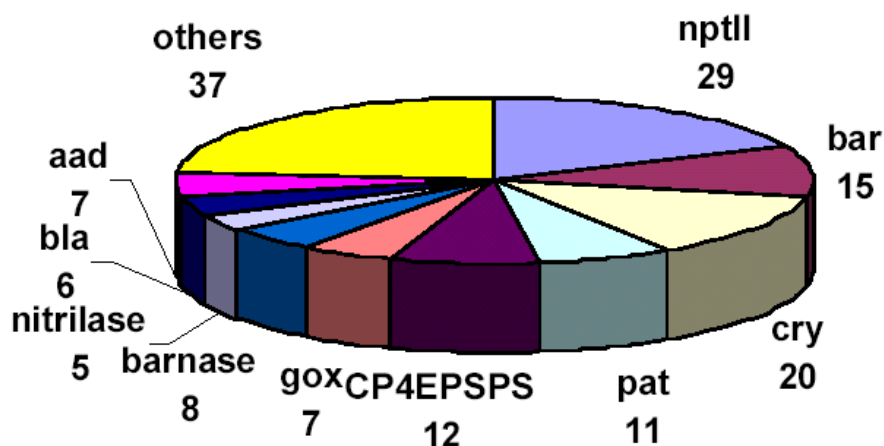
Các phân tích để xác định các gen chuyển chủ yếu dựa vào các phương pháp dựa trên cơ sở ADN. Hơn 40 gen đã được sử dụng để tạo ra các giống cây trồng chuyển gen. Gen chuyển xuất hiện nhiều nhất là *nptII* có nguồn gốc từ gen nhảy của *E.coli*. Gen này có khả năng kháng với các kháng sinh aminoglycoside đã chọn lọc. Trường hợp mà gen *nptII* chịu sự điều khiển của các thành tố di truyền có nguồn gốc từ vi khuẩn thì nó không biểu hiện trong cây. Ngược lại, nếu *nptII* chịu sự điều khiển của promoter có nguồn gốc từ tế bào nhân chuẩn thì nó sẽ biểu hiện trong cây. Các gen Cry có nguồn gốc từ *Bacillus thuringiensis* xuất hiện trong cây trồng chuyển gen nhiều thứ 2 sau *nptII*. Tất cả các gen Cry đều biểu hiện trong thể nhận. Người ta đã tìm thấy trong 20 sản phẩm chuyển gen, trong đó gen xuất hiện nhiều nhất là *CryIA(b)* và *Cry3A*. Trình tự gen *CryIA(b)* đã chuyển vào ngô Bt11, ngô 176, Mon 809 và Mon 810 cho thấy chúng có trình tự khác nhau. Ngoài ra, gen *bar* và *CP4-EPSPS* được tìm thấy trong 12 và 15 cây trồng chuyển gen.

Bảng 22: Thông tin về các gen đã chuyển vào cây trồng biến đổi gen đang được thương mại hoá

Gen	Nguồn gốc	Tần số xuất hiện của mỗi gen
<i>aad</i>	<i>E.coli</i>	7
<i>Accd</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1
<i>AccS</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1

<i>ALS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1
<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	15
<i>barnase</i>	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	8
<i>barstar</i>	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	6
<i>Bay TE</i>	<i>Umbellularia californica</i> (California bay)	1
<i>bla</i>	<i>E. coli</i>	6 (+ 1 part.*)
<i>Chimeric S4-HrA</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i>	29 (+ 7 part.*)
<i>CMV cp</i>	Virus khảm dưa chuột-Chủng C	1
<i>CMV/PRV cp</i>	Virus gây bệnh đốm ở đu đủ và virus khảm dưa chuột	
<i>CMV/WMV 2 cp</i>	Virus khảm dưa hấu-Chủng 2 và Virus khảm dưa chuột	2
<i>CMV/ZYM V cp</i>	Virus khảm vàng Zucchini-Chủng FL và Virus khảm dưa chuột	2
<i>CP4EPSPS</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> sp. strain CP4	12
<i>CryIA(b)</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	6
<i>CryIA(c)</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> HD-73	5
<i>CryIF</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	1
<i>Cry2Ab</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	1
<i>Cry3A</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i>	6
<i>Cry3Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	1
<i>Cry9C</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Tolworthi</i>	1
<i>GmFAD2-1</i>	<i>Glycine max</i>	1
<i>gox</i>	<i>Achromobacter</i> sp. Strain LBAA	7
<i>GUS</i>	<i>E. coli</i>	5
<i>nitrilase</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	5
<i>mEPSPS</i>	<i>Zea mays</i>	1
<i>nos</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1

<i>NtQPT1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	11
<i>PG</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2
<i>pinII</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	1
<i>PLRVrep</i>	Vi rút gây bệnh cuốn lá khoai tây	2
<i>PVYcp</i>	Vi rút gây bệnh ở khoai tây (chủng Y)	1
<i>sam-k</i>	<i>E. coli</i> bacteriophage T3	1
<i>tetR</i>	<i>E. coli</i>	1
<i>dam</i>	<i>E. coli</i>	1
<i>dapA</i>	<i>Corynebacterium</i>	1
<i>gentR</i>	<i>E. coli</i>	1



Hình 29: Các gen được chuyển vào cây trồng biến đổi gen thương mại hoá

3.2. THIẾT KẾ MÔI PCR, THIẾT KẾ MẪU DÒ ĐỂ NHẬN BIẾT MỘT SỐ GEN PHỔ BIẾN ĐƯỢC CHUYỂN VÀO CÂY TRỒNG

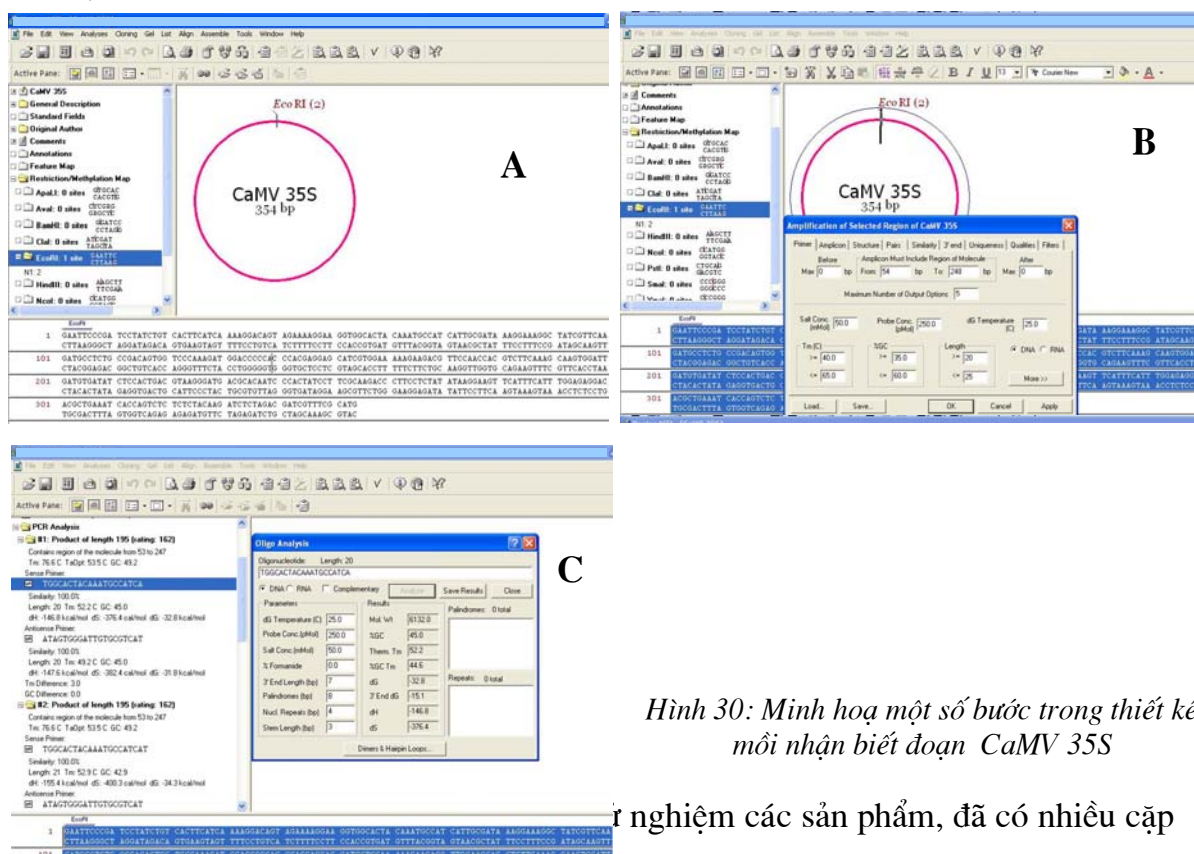
Qua các nghiên cứu người ta thấy rằng phần lớn các vectơ dùng trong biến nạp thực vật đều chứa đoạn khởi động *CaMV 35S*, gen kháng kháng sinh *nptII* (gen chỉ thị) và đoạn gen mong muốn (ví dụ như gen kháng thuốc trừ cỏ (*Bar*), gen kháng sâu (*Cry*),...).

Một trong những gen được chuyển vào cây trồng nhiều nhất là gen kháng sâu *Bt*. Tinh thể độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có nhiều nhóm khác nhau như

CryI, *CryII*, *CryIII*... Tuy nhiên, khi ứng dụng các nhóm độc tố này để tạo khả năng kháng cho cây trồng thì mới chỉ có các vector mang trình tự mã hoá cho tiền độc tố *CryIA(a)*, *CryIA(b)* và *CryIA(c)*. Ngoài ra, gen kháng thuốc trừ cỏ phosphinothricin cũng được biến nạp vào rất nhiều loại cây trồng như đậu tương, ngô, bông,...

Có rất nhiều phần mềm được ứng dụng để thiết kế môi và mẫu dò cho phản ứng PCR và lai ADN. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phần mềm OLIGO. 4 để thiết kế môi và mẫu dò nhận biết đoạn gen *CaMV 35S*, *CryIA*, *CryIA(a)*, *Bar*, *nptII*.

Đầu tiên ta đưa trình tự đoạn gen quan tâm vào phần mềm để tạo dữ liệu cho việc thiết kế môi (hình 30A). Sau đó vào phân tích để thiết kế môi và lựa chọn vùng khuếch đại. Điều chỉnh các thông số như T_m , %GC, chiều dài đoạn môi,...sao cho thích hợp (hình 30B). Phần mềm đưa ra một số cặp môi đã được thiết kế. Từ đó, ta lại sử dụng phần mềm để phân tích từng cặp môi để lựa chọn ra cặp môi thích hợp (hình 30C).



Hình 30: Minh họa một số bước trong thiết kế môi nhận biết đoạn *CaMV 35S*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã có nhiều cặp môi nhận biết các sản phẩm, đã có nhiều cặp môi cho sản phẩm PCR có kích thước khác nhau trên gen. Đặc biệt, cặp môi cho sản phẩm 204 bp trên gen *CryIA* có thể sử dụng cho cả ba loại *CryIA(a)*, *CryIA(b)* và *CryIA(c)*. Ngoài ra, cũng đã thiết kế được những cặp môi cho các gen khác, bảng dưới đây là một số cặp môi đã được thiết kế.

Bảng 23: Trình tự một số môi PCR đã thiết kế để nhận biết GMOs

Gen	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>CryIA(b)</i>	5'-CGGCCCCGAGTTCACCTT-3'	60 ⁰ C	420
	5'-CTGCTGGGGATGATGTTGTTG-3'		
<i>CryIA</i>	5'-ATGGACAACAACCCCAACATC-3'	58 ⁰ C	204
	5'-AAAGATACCCAGATGATGTC-3'		
<i>Bar</i>	5'-TGAGCCCAGAACGACGCCCCG-3'	66 ⁰ C	378
	5'-CAGCCCGATGACAGCGACCACG-3'		
<i>NptII</i>	5'-GCTCTGATGCCGCCGTGTTC-3'	61 ⁰ C	237
	5'-CAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAG-3'		
<i>35S</i> <i>CaMV</i>	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	58 ⁰ C	195
	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'		

Phản ứng tiến hành nghiên cứu ở các điều kiện PCR đã được biến đổi về nhiệt độ và nồng độ của các thành phần hỗn hợp phản ứng. Mỗi cặp môi lại đòi hỏi nhiệt độ gắn môi riêng. Cặp môi thiết kế cho gen Bar do tỷ lệ gốc bazơ-nitơ nhiều G, C nên phải tới 66⁰C mới có thể gắn môi và tổng hợp sản phẩm được. Hầu hết các cặp môi đều cho hiệu suất cao khi chạy ở 40 chu kỳ. Nồng độ môi khác nhau (từ 0,6 μ M – 1,2 μ M) cũng cho độ đậm nét của băng sản phẩm khác nhau theo chiều hướng tăng dần. Ngoài ra, độ sắc nét của các băng cũng còn tăng dần tương ứng với hàm lượng GMO có trong sản phẩm cần kiểm tra từ 0,1%; 0,5%; 1%; 2%; 5%; 10%; và 100%. Ngưỡng để phát hiện sản phẩm chuyển gen có thể từ nồng độ thấp là 0,1% cũng đã cho kết quả dương tính.

Ngoài việc sử dụng kỹ thuật PCR với các đoạn môi đặc hiệu người ta còn sử dụng mẫu dò để nhận biết GMOs. Theo nghiên cứu hiện nay, mẫu dò là phân tử tương tác mạnh với chuỗi đích. Oligonucleotid được sử dụng như là mẫu dò đang ngày càng được sử dụng rộng rãi trong các kỹ thuật sinh học phân tử. Các mẫu dò được sử dụng trong các phương pháp lai phân tử (như Southern blotting, Northern blotting và lai in-situ), quantitative PCR và phương pháp lai sử dụng ADN chip.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành thiết kế mẫu dò về cơ bản cũng phải thoả mãn các điều kiện như quá trình thiết kế môi. Trình tự của ADN mẫu dò có thể dài hơn ít nhiều so với trình tự của một đoạn môi (vài chục bp). Khi tiến hành lai

giữa ADN mẫu dò với ADN khuôn mẫu phải tính toán nhiệt độ lai thích hợp. Phần mềm sẽ tính toán nhiệt độ lai dựa trên các trường hợp cụ thể:

- Không dùng formamide: nhiệt độ lai thường khá cao, sử dụng đối với mẫu dò đánh dấu bằng phóng xạ.

- Dùng formamide (50%): nhiệt độ lai thấp hơn, sử dụng đối với mẫu dò đánh dấu bằng huỳnh quang.

Sau khi thiết kế xong mẫu dò, chúng tôi tiến hành lai ADN mẫu dò với ADN khuôn mẫu để phát hiện gen cần quan tâm.

Từ những kết quả nghiên cứu đã thu được, chúng tôi đã:

- Thiết kế được các cặp mồi PCR để phát hiện các gen được chuyển vào cây trồng như gen kháng thuốc trừ cỏ *PAT*, *EPSPS*, *Bar*... gen kháng sâu *Bt* (*CryI A(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*) gen kháng kanamycin (*Npt II*...).

- Thiết kế được mẫu dò dùng để phát hiện gen *CryIA(c)* trong lai Southern blot và gen - *T-NOS* trong Real-time PCR – là các gen đã được chuyển vào cây trồng.

3.3. SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR VỚI CÁC MÔI ĐẶC HIỆU ĐỂ NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI GEN

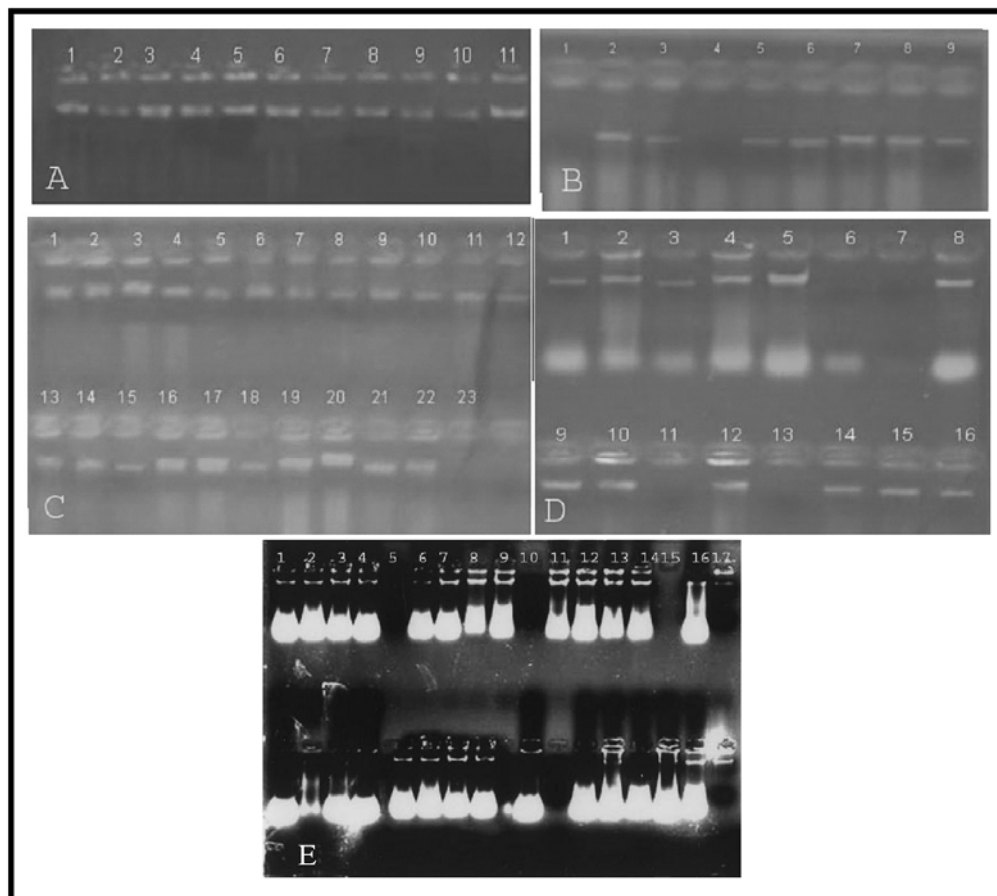
3.3.1. Kết quả tách chiết ADN

Các mẫu lá non của các giống cây chuyển gen được thu thập từ nguồn *in vitro* hoặc gieo hạt và dùng làm nguyên liệu để tách chiết ADN. Chúng tôi đã tách ADN từ các mẫu lá non này theo phương pháp của Hugo & CS (1995) có cải tiến. Mẫu ADN sau khi tách chiết được kiểm tra nồng độ và tính toàn vẹn của chúng nhờ điện di trên gel agarose 1% có bổ sung ethidium bromide, chạy trong 15 phút ở hiệu điện thế 100V. Sau đó kết quả được quan sát trên máy soi UV và chụp lưu lại ảnh. Khi quan sát kết quả điện di, các vạch ADN tổng số sẽ được so sánh với marker lamda ADN ở nồng độ 50ng/μl.

Kết quả điện di cho thấy các mẫu ADN của các giống có nồng độ tương đối đồng đều: đậu tương có nồng độ ADN từ 60-100ng (hình 31C), nồng độ ADN của ngô là 40-80ng (hình 31A), của bông là từ 40-50ng (hình 31B), và của khoai lang là từ 40-60ng (hình 31D) nhưng riêng với giống IP₂ có nồng độ ADN cao nhất là 150ng.

Đối với mẫu thức ăn gia súc, nồng độ ADN ở các mẫu không đồng đều nhau, một số mẫu không có ADN (kể cả ARN, ví dụ như các mẫu ở giống 5, 10, 15 (hàng trên). Trong khi đó, một số mẫu lại có nồng độ ADN cao (khoảng 100 ÷ 150 ng) (hình 31E).

Nồng độ ADN của các mẫu tách chiết này rất thích hợp để sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR.



Hình 31: Kết quả tách chiết ADN của các giống ngô, bông, đậu tương, khoai lang chuyển gen và thức ăn gia súc

3.3.2. Kết quả nhận biết cây trồng biến đổi gen và sản phẩm thức ăn gia súc nhờ phản ứng PCR thông thường

3.3.2.1. Kết quả nhận biết đoạn promoter *CaMV 35S*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cặp mồi 35S1/35S2 (Pietsch & CS) để phát hiện đoạn đặc trưng của *CaMV 35S* có kích thước 195bp trong các mẫu ngô, đậu tương, khoai lang, bông, thức ăn gia súc và mẫu trộn lẫn hạt ngô chuyển gen và không chuyển gen (tỷ lệ trộn lẫn là: 0%; 0,5%; 1%; 2%; 5%; 10% và 100%). Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR cho thấy:

♦ Đối với mẫu ngô: Cả 9 mẫu ADN của 3 giống ngô CG1, CG2, CG3 đều cho kết quả dương tính. Các mẫu này đều xuất hiện băng có kích thước 195 bp giống như mẫu

dương tính chuẩn (ADN của plasmid pART27, plasmid này có chứa promoter *CaMV* 35S), tuy nhiên độ sắc nét kém hơn (hình 32A).

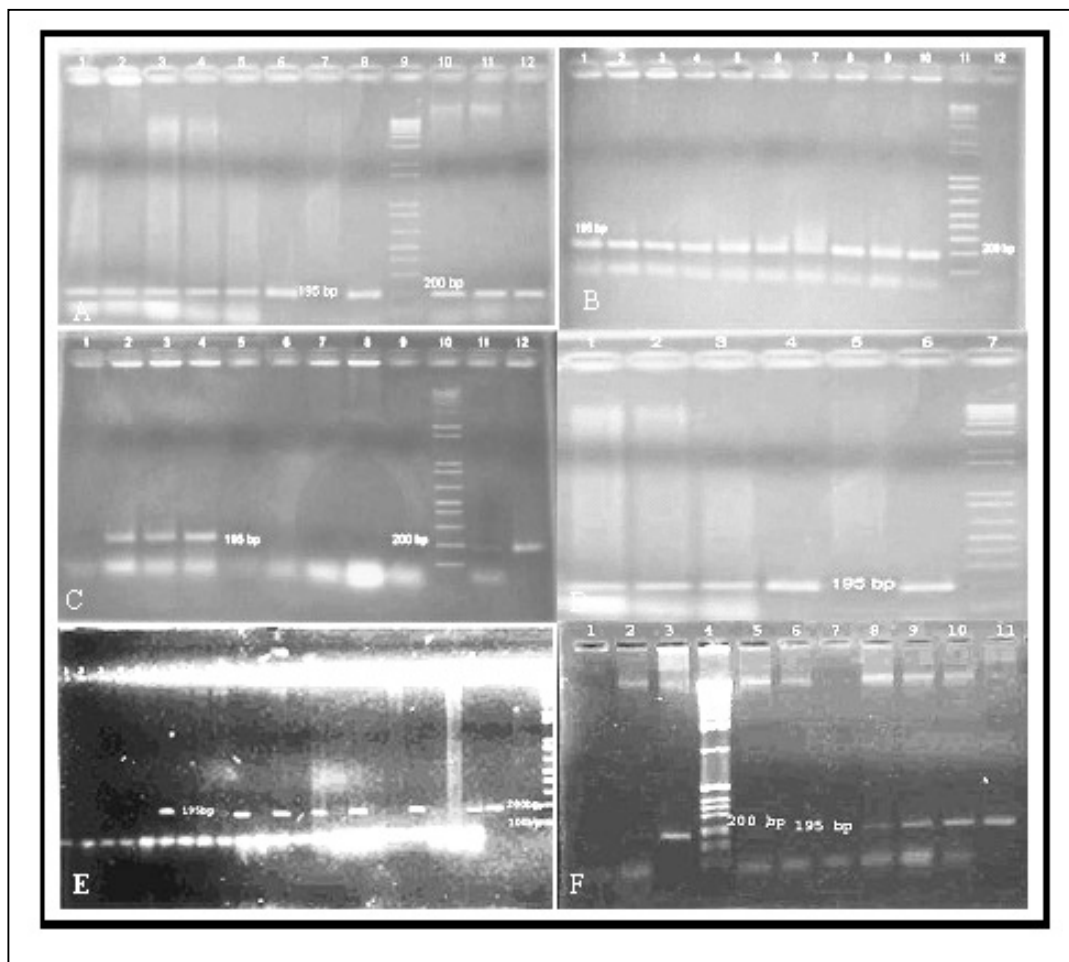
♦ Đối với mẫu đậu tương: Khi chạy phản ứng PCR với các giống đậu tương biến đổi gen thì tất cả đều cho phản ứng dương tính và có độ nhạy cao hơn so với mẫu ngô biến đổi gen. Các mẫu đều cho băng sắc nét và có kích thước 195bp như mong đợi (hình 32B).

♦ Đối với mẫu khoai lang: Trong 4 giống khoai lang sử dụng thì có 3 mẫu cho kết quả dương tính là các giống IP2, IP3, IP4, còn giống IP1 lại cho kết quả âm tính giống với các mẫu đối chứng không biến đổi gen.

Nguyên nhân kết quả âm tính của giống IP1 có thể trong quá trình thao tác, do mẫu ADN bị thoái hoá hoặc do nồng độ ADN thấp, do ADN chưa sạch hoặc do sự có mặt của các chất ức chế (như polyphenol, polysaccharide). Có thể xảy ra phản ứng dương tính sai nếu mẫu cây thí nghiệm bị nhiễm bản hoặc nhiễm nhóm Cruciferae và từ đó *CaMV* 35S sẽ phát sinh từ virus khảm súp lơ (hình 32C).

♦ Đối với mẫu bông: 4 giống bông biến đổi gen sử dụng đều cho kết quả dương tính đối với cặp mồi 35S1/35S2, kích thước của đoạn được nhân bản hoàn toàn tương đương với kích thước của mẫu dương tính chuẩn và tương ứng với kích thước 195bp trên thang marker 1kb (hình 32D).

♦ Đối với mẫu thức ăn gia súc: trong 22 mẫu nghiên cứu thì có 7 mẫu cho phản ứng dương tính, đó là các mẫu thức ăn gia súc T₆, T₁₀, T₁₂, T₁₄, T₁₆, T₁₉, T₂₂ (hình 32E).



Trong đó 4 mẫu là những loại thức ăn gia súc ở dạng bột và 2 mẫu ở dạng viên. Trong 7 mẫu có kết quả dương tính này thì có tới 4 mẫu thức ăn gia súc là loại thức ăn dùng cho gà, 2 mẫu là loại thức ăn dùng cho heo và 1 mẫu là loại thức ăn của ngan, vịt.

Hình 32: Kết quả sản phẩm PCR với cặp mồi 35S1/35S2 của ngô (A), đậu tương (B), khoai lang (C), bông (D), thức ăn gia súc (E), mẫu trộn lẫn sản phẩm chuyển gen và không chuyển gen (2F)

Mẫu ADN của cây chuyển gen: giếng 1-6, 10-12 (32A), 1-10 (32B), 1-4 (32C), 1-4 (32D)

Marker chuẩn 1kb: giếng 9 (32A), 11 (32B), 10 (32C), 7 (32D), 26 (32E), 4 (32F)

Mẫu đối chứng âm tính: giếng 7(32A), 12 (32B), 5-9 (32C), 5(32D), 24 (32E), 2 (32F)

Mẫu đối chứng dương tính: giếng 8 (32A), 12 (32C), 6 (32D), 23 (32E), 3(32F)

Mẫu H₂O (không có ADN): giếng 12 (32B), 11 (32C), 25 (32E), 1 (32F)

Các mẫu thức ăn gia súc: giếng từ 1 ÷ 22 (32E)

Mẫu trộn lẫn sản phẩm chuyển gen và không chuyển gen với các tỷ lệ 0%; 0,5%; 1%; 2%; 5%; 10% và 100%: giếng 5 – 11 (32F)

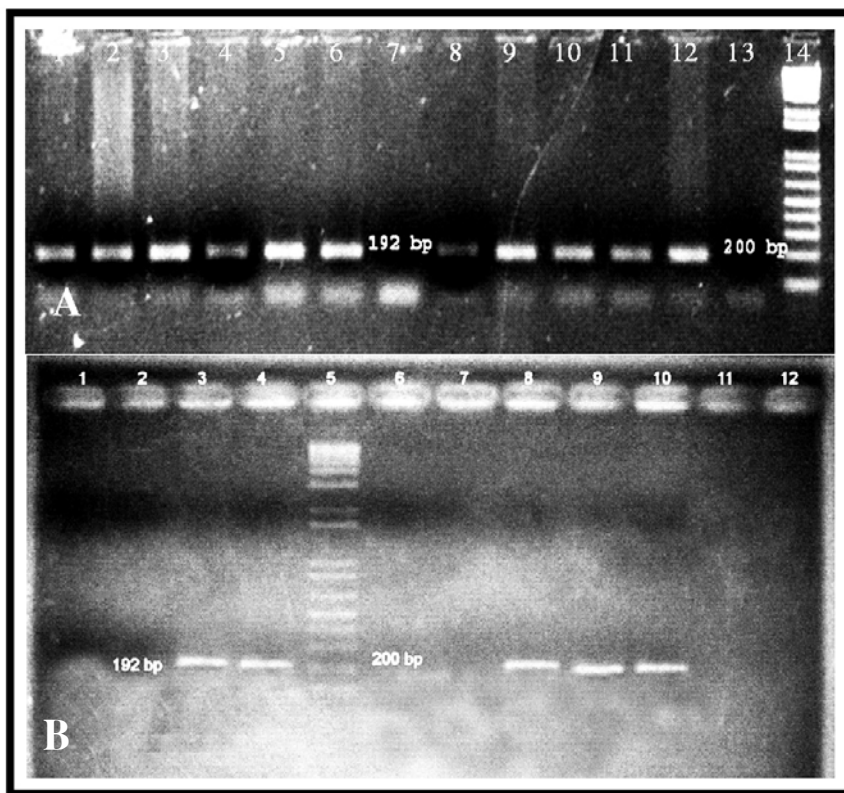
♦ Mẫu trộn lẫn hạt ngô chuyển gen và không chuyển gen: ở hàm lượng GMO tăng dần từ 0% ÷ 100% (từ giếng 5 ÷ 11 – hình 32F) có sự xuất hiện của 4 băng

kích thước 195 bp. Bốn băng này có độ sắc nét tăng dần tương ứng với hàm lượng GMOs trộn lẫn là: 2%, 5%, 10% và 100% GMOs (giếng 8, 9, 10, 11 - hình 32F). Ở hàm lượng 100% GMOs, phản ứng cho băng sắc nét hơn cả. Trong khi ở hàm lượng 0%, 0,5% và 1% GMOs, cũng như ở mẫu âm tính chuẩn và mẫu không có ADN (mẫu H₂O) lại không thấy có sự xuất hiện của băng 195 bp.

Như vậy với quy trình phản ứng PCR mới này, giới hạn phát hiện của nó đối với mẫu ngô GM trộn lẫn là 2%

3.3.2.2. Kết quả nhận biết đoạn *T-NOS*

Cặp môi NOS^F/ NOS^R khuếch đại đoạn trình tự dài 192bp trên vùng kết thúc *T-NOS*. Đây cũng là một dấu hiệu nhận biết gián tiếp sự có mặt của gen chuyển vì hầu hết các thực vật biến đổi gen đều mang đoạn *T-NOS* này. Chúng tôi đã sử dụng cặp môi NOS^F/ NOS^R để xác định ngô và khoai lang chuyển gen nhằm tìm ra quy trình phản ứng PCR thích hợp đối với cặp môi này. Và kết quả điện di sản phẩm PCR thể hiện ở hình 33 cho thấy:



Hình 33: Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi NOS^F/NOS^R của ngô (A) và khoai lang (B)

Mẫu ADN của cây chuyển gen: giếng 1-5, 8-12 (33A), 3, 4, 9, 10 (33B)

Marker chuẩn 1kb: giếng 14 (33A), 5 (33B)

Mẫu ADN của cây không chuyển gen: giếng 7(33A), 1,2, 6 (33B)

Mẫu đối chứng dương tính: giếng 6 (33A), 8 (33B)

Mẫu H₂O (không có ADN): giếng 13 (33A), 7 (33B)

♦ Tất cả các mẫu ngô đều cho kết quả dương tính với cặp mồi NOS^F/NOS^R và các băng ADN rõ nét. Khi so sánh với marker chuẩn 1kb thì các băng đều có kích thước 192bp cũng giống như mẫu dương tính chuẩn. Điều đó cho thấy các mẫu ngô trong nghiên cứu này đều là các giống biến đổi gen có mang đoạn *T-NOS* (hình 33A).

♦ Trong 6 giống khoai lang thì có 4 mẫu đó là IP1, IP2, IP3, IP4 đều cho kết quả dương tính giống với mẫu dương tính chuẩn, còn hai mẫu không biến đổi gen thu thập ngoài thị trường thì cho kết quả âm tính.

Qua đó cho thấy cặp mồi NOS^F/NOS^R cho kết quả kiểm tra khá chính xác, ngoài 3 mẫu cho kết quả dương tính giống với kết quả của cặp mồi 35S1/35S2, nó còn cho kết quả dương tính với mẫu IP1 cũng là mẫu khoai lang biến đổi gen do phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử cung cấp (hình 33B).

3.3.2.3. Kết quả phát hiện một số đoạn đặc trưng trong gen *CryIA(b)*

Có rất nhiều cây trồng được chuyển gen kháng sâu, mà thường là gen *Bt*. Cho nên đã có những cây trồng chuyển gen được gắn liền với tên của gen này, ví dụ như ngô *Bt*, bông *Bt*. Người ta thấy rằng gen *CryIA(b)* đã được chuyển vào rất nhiều loại cây trồng như các giống lúa, ngô và các giống đậu tương. Vì vậy chúng tôi đã ứng dụng kỹ thuật PCR để nhận biết gen *Cry IA(b)* này trong các mẫu cây thí nghiệm.

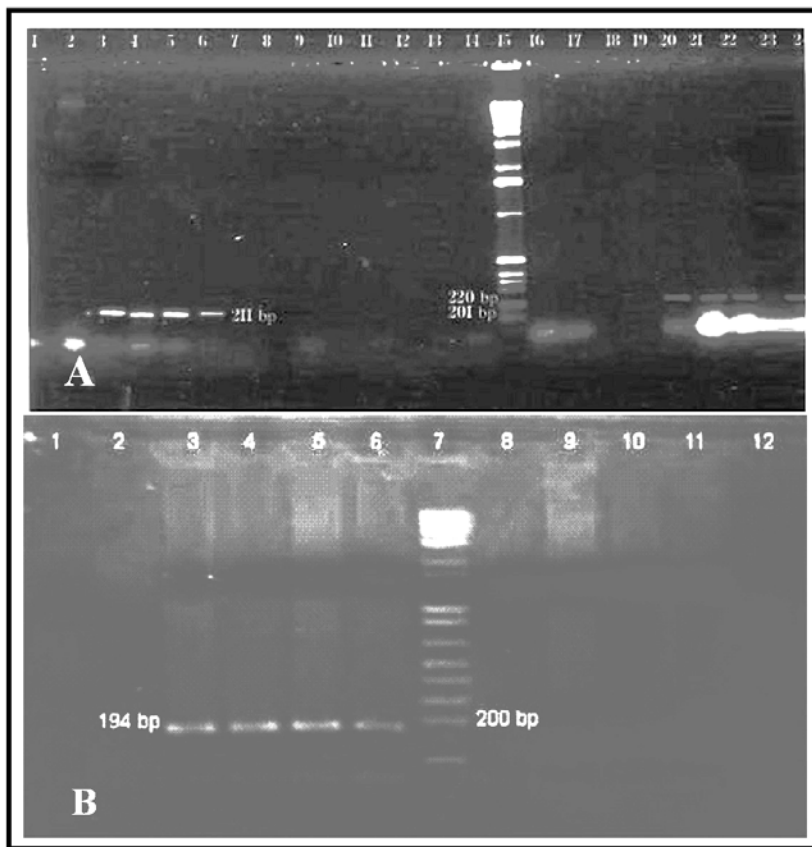
Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng riêng rẽ 2 cặp mồi đó là CDPK-cry03/CDPK-cry04 khuếch đại đoạn 211bp để phát hiện gen *Cry IA(b)* và HS01/Cry-CR01 khuếch đại đoạn trình tự dài 194bp trên gen *CryIA(b)*. Gen *Cry* này thường được chuyển vào các giống ngô và bông biến đổi gen để kháng sâu đục thân.

Kết quả kiểm tra cho thấy:

♦ Với cặp mồi CDPK-cry03/CDPK-cry04: Trong tổng số 23 mẫu thử phản ứng (3 mẫu đối chứng (mẫu H₂O, mẫu âm tính chuẩn, mẫu ADN plasmid pART₂₇), 11 mẫu của 4 giống ngô chuyển gen và 9 mẫu thức ăn gia súc chứa GMOs) thì có 7 mẫu xuất hiện băng kích thước 211 bp mong đợi (3 mẫu của giống ngô biến đổi gen và 4 mẫu thức ăn gia súc. Trong khi các mẫu H₂O và mẫu âm tính thì không có băng sản phẩm PCR.

Sản phẩm PCR với trình tự 211bp đã được khuếch đại đoạn liên hợp từ vị trí 73bp trong vùng promoter của gen *Cry IA(b)* và tại vị trí 138bp trên gen cấu trúc trong các sản phẩm biến đổi gen.

Từ kết quả này chúng ta có thể khẳng định rằng giống ngô CG1, CG2, CG3 là các giống ngô chuyển gen kháng sâu và trong số 7 mẫu thức ăn gia súc thu thập trên thị trường có chứa GMO thì 4 mẫu là chứa sản phẩm của cây trồng chuyển gen kháng sâu. Qua đó cũng cho thấy cặp mồi CDPK-cry03/CDPK-cry04 có tính nhạy và có khả năng nhận biết đối với cả 2 vùng gen: gen cấu trúc và gen điều hòa, cho phép kiểm tra đoạn liên hợp của 2 vùng gen này trong ngô biến đổi gen với chu trình PCR thích hợp (hình 34A).



Hình 34: Kết quả sản phẩm PCR với cặp mồi CDPK-cry03/CDPK-cry04 nhận biết ngô Bt, thức ăn gia súc có chứa GMC mang gen Bt (A) và cặp mồi HS01/Cry-CR01 nhận biết bông Bt (B)

Ngô chuyển gen: giếng 4- 14 (34A), 9-10 (34B); Bông chuyển gen: giếng 3-6 (34B)

Marker chuẩn 1kb: giếng 15 (34A), 7 (34B)

Mẫu âm tính: giếng 2 (34A); Mẫu đối chứng dương tính: giếng 3 (34A)

Mẫu H₂O (không có ADN): giếng 1 (34A), 8 (34B)

Mẫu thức ăn gia súc có chứa GMO: giếng từ 16 ÷ 24 (34A)

♦ Cặp mồi HS01/Cry-CR01: Khi chạy phản ứng PCR kiểm tra với các giống bông và ngô để nhận biết đoạn 194bp trên gen *CryIA(b)* thì chỉ có mẫu bông cho kết quả dương tính (hình 34B).

Từ đó cho thấy: ngô và bông cùng được chuyển gen *CryIA(b)* nhưng với các cặp môi khác nhau thì khuếch đại các trình tự khác nhau và cho kết quả phản ứng PCR khác nhau. Nguyên nhân là do mỗi loại vectơ thiết kế là khác nhau mặc dù chúng cùng mang một loại gen. Qua kết quả này ta có thể kết luận rằng cặp môi HS01/Cry-CR01 đặc hiệu với các giống bông chuyển gen và có thể sử dụng cặp môi này để nhận biết bông biến đổi gen.

3.3.2.4. Kết quả nhận biết một trong số các gen kháng thuốc trừ cỏ (PAT) của cây trồng biến đổi gen

Gen Phosphinothricin-N-acetyltransferase (*PAT*) là một trong những gen kháng thuốc trừ cỏ đã được chuyển vào một số cây trồng như ngô và đậu tương. Có rất nhiều cặp môi đã được thiết kế để nhận biết các vùng trình tự khác nhau của gen này và trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cặp môi PA01/CM01 khuếch đại trình tự 437 bp trên vùng gen cấu trúc của gen *PAT* (ở mẫu ngô mang gen *PAT*, các mẫu ngô và thức ăn gia súc chuyển gen) và cặp môi PA01/CM03 để khuếch đại đoạn trình tự dài 231bp trên gen *PAT* ở các mẫu ngô thí nghiệm.

Để khuếch đại 2 đoạn trình tự trên của gen *PAT*, chúng tôi đã sử dụng các mẫu ADN ngô tách chiết từ lá có phản ứng dương tính với cặp môi 35S1/35S2.

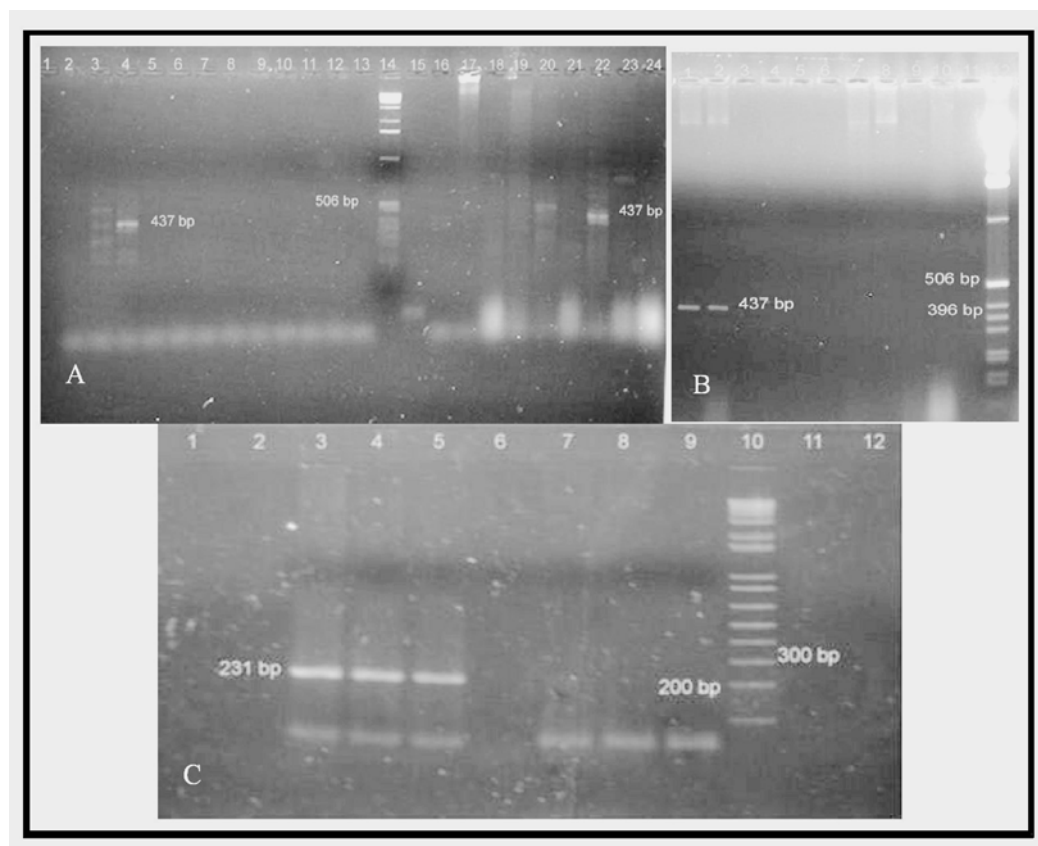
♦ Đối với cặp môi PA01/CM01: có sự xuất hiện của 4 băng sản phẩm PCR (hình 35A). Khi so sánh với thang marker ADN 1 kb thấy có 2 băng mong đợi kích thước 437 bp (giếng 4 và 22 - hình 35A) - hai băng này xuất hiện rõ và sắc nét hơn so với 2 băng sản phẩm PCR còn lại (1 băng của mẫu lá ngô GM và 1 băng của mẫu thức ăn gia súc chứa GMOs). Hai băng sản phẩm PCR còn lại rất mờ: 1 băng kích thước khoảng 506 bp và 1 băng kích thước khoảng trên 800 bp.

Để khẳng định kết quả nhận biết gen *PAT* một cách chính xác, chúng tôi đã tiến hành PCR nhận biết gen *PAT* với mẫu ADN tách chiết từ hạt ngô GM mang gen *PAT*, lá của các giống ngô chuyển gen ở trên và các mẫu thức ăn gia súc GM. Kết quả cho thấy 2 mẫu ADN tách chiết từ hạt ngô GM mang gen *PAT* có sự xuất hiện của 2 băng kích thước 437 bp như mong đợi (giếng 1, 2 – hình 35B). Trong khi tất cả các mẫu thí nghiệm khác không thấy băng sản phẩm PCR này.

Từ 2 kết quả trên cho thấy: có thể có những kết quả dương tính sai – nguyên nhân có thể do trong quá trình tách chiết ADN bị gãy. Ngoài ra, do PCR là một kiểu phản ứng enzym nên có một số nhân tố ảnh hưởng, tác động đến phản ứng enzym này thì cũng có thể gây nên kết quả PCR sai. Các nhân tố này bao gồm

chuẩn bị mẫu ADN, môi, các thành phần khác của phản ứng PCR... không được đồng đều (do kỹ thuật thao tác) và sự tồn tại của nhân tố ức chế trong mẫu ADN tổng số. Kết quả âm tính sai cũng có thể là do các nhân tố trên.

Các phản ứng PCR sai này có thể được giảm tới mức thấp nhất nếu ta sử dụng các GMOs chuẩn như là một tiêu chuẩn so sánh dương tính. Và mẫu hạt ngô GM mang gen *PAT* trong thí nghiệm này có thể được xem như là mẫu GMOs chuẩn, để đảm bảo kỹ thuật PCR ở trên là phản ứng PCR chính xác, có thể xác định được gen *PAT* với trình tự 437 bp sử dụng cặp môi PA 01/CM 01.



Hình 35: Kết quả sản phẩm PCR với cặp môi PA01/CM01 (A, B) và PA01/CM03(C) phát hiện gen *PAT* của các mẫu ngô, thức ăn gia súc

Ngô chuyển gen: giếng 1-13 (35A); 3-5 (35B); 1-8 (35C)

Marker chuẩn 1kb: giếng 14 (35A); 12 (35B); 10 (35C)

Mẫu âm tính: giếng 16 (35A); 11 (35B); 9 (35C)

Mẫu H₂O (không có ADN): giếng 15 (35A); 11(35C)

Mẫu thức ăn gia súc chứa GMO: giếng 18 – 24 (35A), 6-10 (35B)

Mẫu hạt ngô mang gen *PAT*: giếng 1,2 (35B)

♦ Đối với cặp môi PA01/CM03: có sự xuất hiện của 3 băng kích thước 231 bp và 3 mẫu thí nghiệm này đều là giống ngô CG3 (hình 35C).

Điều đó chứng tỏ giống ngô CG3 là giống ngô mang cả gen *Bt* kháng sâu và gen *PAT* kháng thuốc trừ cỏ.

Như vậy, chúng tôi đã:

- Nhận biết được các cây trồng chuyển gen thông qua việc xác định đoạn promoter *CaMV 35S* của virus khảm súp lơ hay đoạn *T-NOS* của *Agrobacterium*.
- Đã tìm ra quy trình thích hợp để nhận biết các cây trồng chuyển gen và xác định được cây trồng mang gen *CryIA(b)* và gen *PAT*.
- Phát hiện được một số loại thức ăn gia súc thu thập trên thị trường có chứa sản phẩm của cây trồng biến đổi gen, cụ thể là sản phẩm của cây trồng có chứa gen *CryIA(b)*, gen *PAT*, *CaMV 35S*.

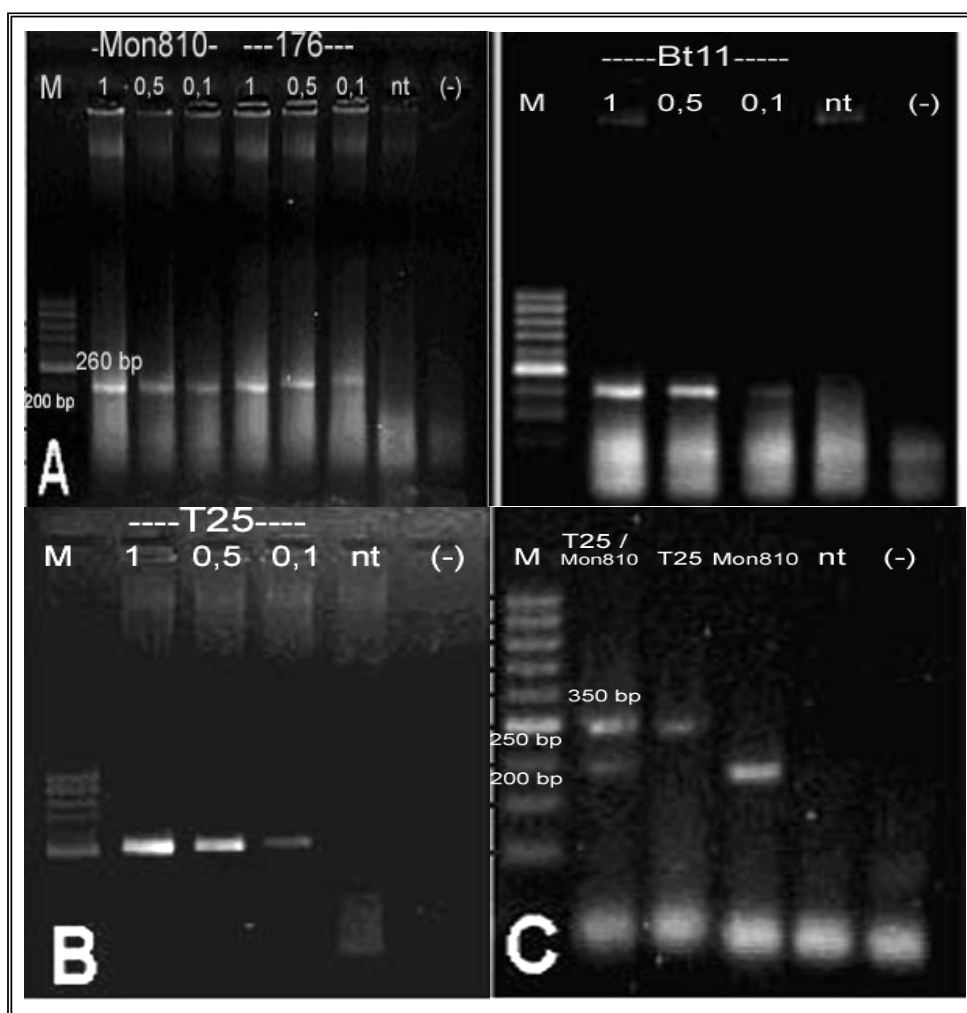
3.3.3. Kết quả nhận biết cây trồng biến đổi gen nhờ phản ứng multiplex-PCR và Realtime-PCR

3.3.3.1. Phát hiện GMCs nhờ phản ứng multiplex-PCR

Cặp mồi để khuếch đại vùng gen *CryIA(b)* tổng hợp có trong ngô 176, BT11 và Mon810 đã được thiết kế (bảng 3, cặp mồi 1F và 1R). Trình tự tương ứng với gen *Bt* có trong dòng 176 và BT11 được sử dụng để thiết kế. Hình 36A cho thấy đoạn khuếch đại có kích thước 204bp, đoạn này không chỉ có trong ADN đích của các dòng 176 và BT11, mà còn có trong cả dòng Mon810. Từ đó trình tự sau cùng không phát hiện được, đơn vị sao chép tương ứng được giải trình tự (Hình 37). Trình tự đơn vị sao chép ADN dịch mã thành 68 amino axit đầu tiên của polypeptide *CryIA(b)* tự nhiên.

Trình tự gen *PAT* tổng hợp có trong dòng T25, là dòng ngô kháng thuốc trừ cỏ ammonium glufosinate, được phát hiện nhờ cặp mồi 2F/R. Cặp mồi này khuếch đại đoạn 262bp tương ứng với gen chuyển đang quan tâm (hình 36B). Bốn mồi đã miêu tả ở trên được dùng để phát hiện đồng thời gen *CryIA(b)* và *PAT* trong phản ứng multiplex PCR (hình 36C), với 1% ADN của Mon810 và 1% ADN của T25. Ở nồng độ 0,1% ADN chuyển gen cũng đã cho phản ứng dương tính một cách rõ ràng (hình 36A và 36B).

Phản ứng multiplex PCR này được tối ưu hoá kết hợp với 4 mồi ở các nồng độ khác nhau (1F/R ở nồng độ 0,25 μ M, 2F ở nồng độ 0,067 μ M và 2R ở nồng độ 0,125 μ M), bổ sung thêm 3mM MgCl₂ và ủ ở nhiệt độ 58⁰C. Độ nhạy của phản ứng là 0,5%. Như vậy chỉ một phản ứng là đủ để xác định bất kì dòng nào trong 4 dòng ngô chuyển gen (176, BT11, Mon810 và T25) mà có thể thấy trong các hạt thương mại.



Hình 36: Kết quả điện di sản phẩm của multiplex PCR và PCR đơn đối với gen Bt và PAT

- (A): đoạn gen Bt kích thước 204 bp
 (B): gen PAT có kích thước 262 bp
 (C): Phản ứng multiplex khuếch đại cả hai gen
 nt: mẫu không chuyển gen
 (-): mẫu đối chứng không có khuôn ADN

M: THANG MARKER 50 BP

1, 0.5 và 1% là tỷ lệ mẫu ADN chuyển gen trong 50 ng ADN tổng số của các dòng chuyển gen Mon810, 176, Bt11 và T25

Trước đây các môi nhận biết ngô Bt đã được công bố, sử dụng PCR đơn [69, 88, 123]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi các điều kiện PCR được cải tiến thì một trong những cặp môi mà ủ với vùng mã hoá gen *CryIA(b)* [123] từ dòng 176 phát hiện kém hơn dòng Mon810 khuếch đại đoạn kích thước 420 bp mong muốn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cặp môi mới phát hiện vùng mã hoá gen *CryIA(b)* đã được nói ở trên có mặt trong dòng ngô chuyển

gen. Bên cạnh đó cũng có thể sử dụng một cặp mồi khác trong phản ứng multiplex để phát hiện sự có mặt của gen *PAT* trong các dòng chuyển gen khác. Gần đây việc sử dụng multiplex-PCR để phát hiện và nhận biết các dòng chuyển gen trong các mẫu ngô được đề nghị bởi Matsuoka và Cs [89]. Họ đã sử dụng multiplex để xác định 5 dòng ngô chuyển gen khác nhau với độ nhạy 0,5% đối với mỗi GMOs.

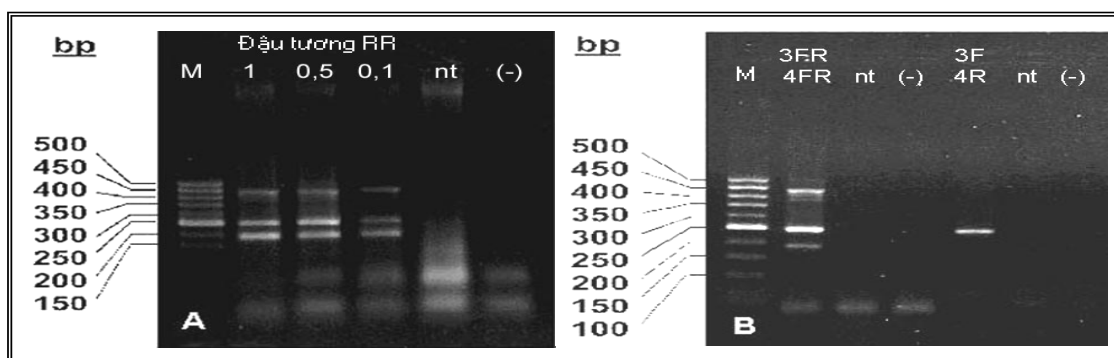
Chúng tôi cũng đã thực hiện phản ứng multiplex PCR khác để phát hiện chính xác và đồng thời các đoạn gen *EPSPS* và *T-T-NOS*, cả hai tương ứng với đơn vị dịch mã của gen đưa vào trong đậu tương chuyển gen Roundup Ready nhờ sử dụng các mồi 3F/R và 4F/R. Phản ứng khuếch đại riêng các đoạn 447bp và 192bp (hình 38A). Bảng thứ ba của đoạn 252bp xuất hiện thích hợp trong phản ứng này.

1-ATG GAC AAC AAC CCC AAC ATC AAC GAG TGC ATC CCG TAC AAC TGC CTC AGC AAC CCT GAG
M D N N P N I N E C I P Y N C L S N P E
61-GTC GAG GTG CTC GGC GGT GAG CGC ATC GAG ACC GCT TAC ACC CCC ATC GAC ATC TCC CTC
V E V L G G E R I E T G Y T P I D I S L
121-TCC CTC ACG CAG TTC CTG CTC AGC GAG TTC GTG CCA GGC GCT GGC TTC GTC CTG GGC CTC
S L T Q F L L S E F V P G A G F V L G L
181-GTG GAC ATC ATC TGG GGT ATC TTT
V D I I W G I F

Hình 37: Trình tự và sự chuyển dịch peptid của đơn vị sao chép được khuếch đại từ cặp mồi 1F/1R tương ứng với đoạn gen *Bt* có trong dòng ngô Mon810. Trình tự có gạch chân tương ứng với các mồi đã sử dụng để khuếch đại

Đơn vị sao chép này được phát hiện bởi mồi xuôi *T-NOS* và mồi ngược *EPSPS* (hình 38B). Giải trình tự đoạn khuếch đại có kích thước 252 bp từ phức hợp (hình 38B, bảng 1) và từ bảng 2 (hình 38B) đã cho các kết quả giống nhau, chúng tương ứng với 1 phần bản sao thứ 2 đã cắt ngắn của gen chuyển ở đầu 3' của đơn vị sao chép đầu tiên, giống như Windels & CS đã miêu tả trước đây [142]. Độ nhạy của phản ứng multiplex này là 0,1%.

Như vậy so với PCR truyền thống thì phản ứng multiplex sử dụng trong nghiên cứu này dùng để nhận biết *CaMV 35S*, *T-NOS*, đoạn nối giữa gen *EPSPS* và *CaMV 35S* cho các kết quả chính xác hơn, bởi vì các đoạn của đơn vị sao chép giống nhau này được khuếch đại đồng thời.



Hình 38: Phản ứng multiplex PCR của các đoạn EPSPS và T-NOS có mặt trong đậu tương Roundup Ready

(A): Phản ứng multiplex PCR của các đoạn EPSPS và T-NOS, tạo ra các băng có kích thước 447 bp và 192 bp

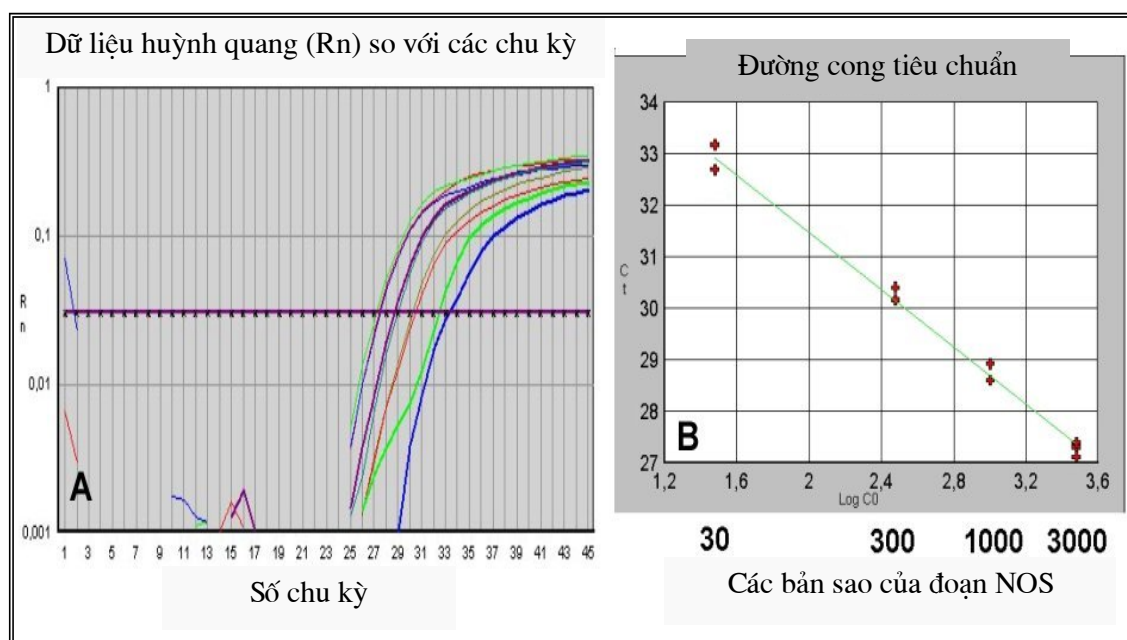
(B): Băng 1 (3FR/4FR) tương ứng với hình A; băng 2 (3F/4F) sử dụng môi xuôi từ T-NOS và môi ngược từ EPSPS

nt: Mẫu ADN không chuyển gen; M: Thang marker 50 bp

(-): Mẫu đối chứng không có khuôn ADN (mẫu nước)

1; 0,5 và 0,1% là lượng ADN chuyển gen trong 34ng ADN tổng số

3.3.3.2. Phát hiện GMCs nhờ phản ứng Real-time PCR



Hình 39: Real time PCR của đoạn T-NOS từ đậu tương Roundup Ready, sử dụng Đồ thị khuếch đại (A) và đường cong tiêu chuẩn (B) đã tạo ra 3000; 1000, 300 và 30 bản sao của đoạn T-NOS có trong đậu tương chuyển gen khi sử dụng hệ thống phát hiện TaqMan cho thấy giá trị $R^2 = 0,997$ và dừng ở -3,62

Cập môi, mẫu dò huỳnh quang và lai bên trong dùng để phát hiện đoạn T-NOS có trong ADN đậu tương Roundup Ready, ngô GA21 và các cây trồng chuyển gen khác đã được thiết kế để định lượng real time PCR (môi 5F và 4R, mẫu dò P1). Đường

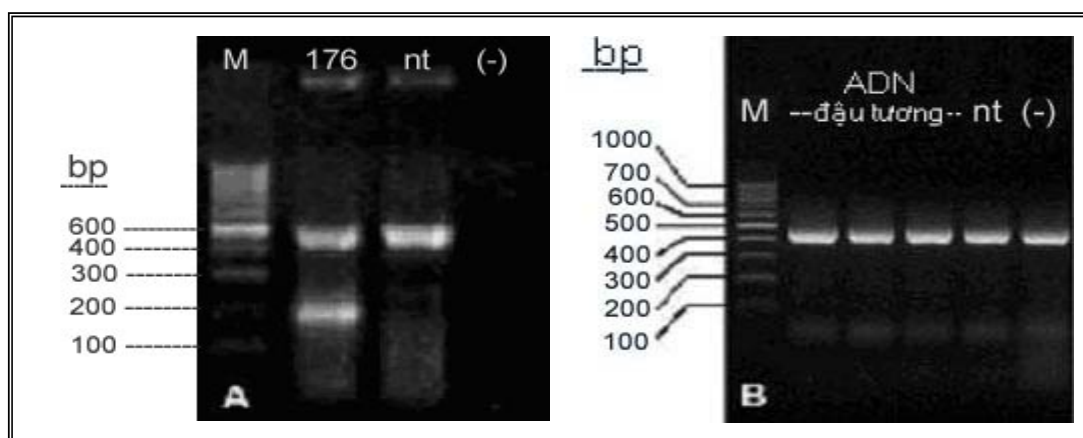
cong tiêu chuẩn với 100% đậu tương Roundup Ready đã được thiết lập với hàng loạt dịch pha loãng để thể hiện từ 30 - 3000 bản sao của gen chuyển với 34 ng ADN tổng số (ví dụ: 30.000 bản sao). Cả ADN của mẫu đậu tương chuyển gen và không chuyển gen đều có nồng độ là 34 ng. Đường cong này cho thấy sự tương quan (R^2) là -0,997 và giá trị dừng là -3,63 (hình 39). Số lượng ADN của gen chuyển thấp nhất (30 bản sao, tương ứng với 0,1% ADN tổng số) đã được quan sát sau 33 chu kỳ (hình 39B).

Vaitilingom & CS [135] thiết kế các cặp môi và mẫu dò huỳnh quang cho real time PCR (TaqMan) đối với gen *EPSPS* có trong đậu tương Roundup Ready và gen *CryIA(b)* có trong dòng ngô 176. Sau đó Trapamann [131] đã đưa ra một cặp môi và một mẫu dò để xác định số lượng *CaMV 35S* có trong đó. Gần đây có 3 báo cáo miêu tả việc định lượng đậu tương chuyển gen bằng Real Time PCR, đề xuất việc khuếch đại vùng nối của gen chuyển và ADN của cây trồng. Phương pháp của chúng tôi dựa vào việc định lượng đoạn kết thúc *T-NOS* bằng Real Time PCR có thể được sử dụng theo cách chung và đáng tin cậy để định lượng sự có mặt của đậu Roundup Ready, ngô GA21 và các cây trồng chuyển gen khác xuất hiện trên thị trường.

Tuy nhiên việc định lượng các gen chuyển được đưa vào genome của ngô có thể không đáng tin cậy. Các nhà nghiên cứu cảnh báo rằng: trong một protocol Real Time PCR thì số bản sao của gen chuyển được xác định và được phân chia thành các bản sao ADN tổng số, theo tỷ lệ phần trăm. Việc định lượng gen chuyển có trong mẫu hạt ngô có thể không tin cậy được, do trong thực tế số lượng bản sao của gen chuyển phụ thuộc vào các trường hợp xuất hiện trong chúng. Ví dụ, một bản sao của *CaMV 35S* có mặt trong dòng T25 và Mon810, 2 bản sao là trong dòng BT11 và 2-5 bản sao là trong dòng 176. Hơn nữa, nếu các hạt lai thương mại là nửa tiếp hợp (chỉ một dòng thuộc bố mẹ chuyển gen) như trong dòng Mon810 [132], các hạt đã thu hoạch là hỗn hợp của các gen đồng hợp tử (2 bản sao của gen chuyển / genome lưỡng bội), nửa tiếp hợp (một bản sao của gen chuyển / genome lưỡng bội) và các hạt không chuyển gen. Cũng phải chú ý đến nguồn gốc của ADN chuyển gen đối với các đường cong chuẩn. Việc sử dụng plasmid [128] hoặc ADN từ dòng Mon810 [132] là chính xác hơn mẫu đối chứng đã chuẩn bị với dòng 176 (Bột ngô IRMM 411, Fluka). Điều cuối cùng là lợi ích của việc định lượng các mẫu chỉ chứa dòng 176 từ đó có sự đánh

giá không đúng về số bản sao gen chuyển có thể xảy ra nếu các hạt từ các dòng khác có mặt trong mẫu.

Để đánh giá chất lượng của ADN trong phản ứng PCR thông thường hoặc trong định lượng RT-PCR, việc khuếch đại gen nội bào như lectin trong đậu hoặc zein trong ngô đã được đề xuất [69, 70, 80, 94, 123, 142]. Phương pháp có thể không thuận lợi nếu phát hiện thấy sự có mặt của các chất ức chế trong mẫu ADN bởi vì gen nội bào có thể được phát hiện ngay cả khi sự khuếch đại đã bị ức chế một phần, trong khi đó hàm lượng gen chuyển có thể giảm. Nói theo cách khác, với 100ng ADN ngô trong ống PCR, thì gần như 37.000 bản sao của bản sao đơn gen nội bào có mặt như kết quả khuếch đại, trong khi đó 37.000 bản sao của gen chuyển sẽ được phát hiện nếu hàm lượng để phát hiện yêu cầu là 0,1%. Một lựa chọn khác nữa là để giảm bớt nồng độ các môi của gen nội bào. Chẳng hạn như, đã thực hiện thành công phản ứng multiplex để phát hiện zein và *CaMV* 35S, mỗi zein được thêm vào ở nồng độ 0,08 μ M, trong khi đó các môi cho *CaMV* 35S giữ ở 0,35 μ M (hình 40A). Nồng độ các môi thấp để zein hạn chế sự khuếch đại của chúng, nếu có chất ức chế, thì nó có thể bị phát hiện. Theo nghiên cứu của Matsuoka và Cs [89] đã nghiên cứu được mức độ tăng chậm của giới hạn phát hiện trong gen chuyển. Điều này có thể giải thích nhờ giảm sự cạnh tranh giữa các nhân tố giới hạn.



Hình 40: Đánh giá chất lượng ADN đã tách chiết

(A): Các sản phẩm khuếch đại của multiplex PCR đối với gen zein nội sinh và đoạn promoter *CaMV* 35S sử dụng các môi không tương xứng. Mẫu chứa 0,1% ADN của ngô 176

(B): Các sản phẩm khuếch đại của gen EPSPS, mẫu chứa 0,5% ADN của đậu tương chuyển gen

M: Thang marker 100 bp; (-): Mẫu đối chứng không có khuôn ADN (mẫu nước)

nt: mẫu ADN của ngô không chuyển gen (40A), của đậu tương không chuyển gen (40B)

Một cách khác để khẳng định rằng các kết quả âm tính không phải là âm tính sai, mà nguyên nhân là do các chất ức chế có trong hỗn hợp mẫu ADN chuyển gen (tương ứng với hàm lượng phát hiện được). Nếu không phát hiện được gen chuyển thì có thể do mẫu ADN chưa tinh sạch. Ví dụ 3 mẫu ADN đậu tương khác nhau mà cho kết quả PCR âm tính đối với gen *EPSPS* được phân tích nhờ tiến hành ở hàm lượng hỗn hợp phản ứng PCR là 0,5% ADN đậu Roundup Ready/mẫu. Kết quả hình 40B chỉ ra rằng ADN có thể được khuếch đại và các mẫu có chứa chất ức chế cho kết quả âm tính.

Cuối cùng cách thứ ba để đánh giá sự có mặt của chất ức chế được bổ sung vào như là đối chứng nội sinh đối với hỗn hợp phản ứng tương đương, số lượng ADN chuyển gen từ cây trồng khác nhau (ví dụ thêm ADN từ mẫu đậu tương chuyển gen vào mẫu ADN ngô) tương đương với mức độ nhạy đã yêu cầu. Điều này cũng có sức hút với Real Time PCR. Trong một thí nghiệm ADN đậu tương chuyển gen với hàm lượng 0,5% được thêm vào hỗn hợp phản ứng và mẫu ngô chứa 1% và 0,1% ADN chuyển gen Mon810, được phân tích đối với gen *EPSPS* bằng Real Time PCR [135]. Cả hai mẫu cho thấy giá trị Ct (Chu kỳ ngưỡng ban đầu) giống nhau ở bất kỳ ngưỡng điều khiển nào khi khuếch đại đối chứng nội sinh. Hơn nữa không có sự khác biệt về giá trị Ct giữa mẫu nghiên cứu và mẫu nước, điều này cho thấy rằng không có chất ức chế trong phản ứng. Sau đó mẫu được phân tích để xác định số lượng *CaMV 35S* nhờ sử dụng hệ thống nhận biết TaqMan. Các kết quả cho thấy các giá trị $0,9 \pm 0,04$ và $0,12 \pm 0,02\%$ đối với mẫu ngô chứa 1% và 0,1% GMO, trong khi đó số lượng ước tính của ADN chuyển gen trong đậu tương đã sử dụng như đối chứng nội sinh là $0,53 \pm 0,05\%$ (bảng 21).

Đồng nhất mẫu trước khi tách ADN là một điểm đáng lưu ý. Đồng nhất bột là một quá trình khó, đặc biệt khi mẫu lớn khoảng 1kg hoặc hơn thế. Có một cách để giải quyết vấn đề này là tách ADN từ mẫu nguyên vẹn. Biện pháp này có hiệu quả nhưng chưa thực tế bởi vì cần một thể tích đệm chiết lớn. Trapmann và Cs [131] đã sử dụng một protocol bao gồm một dịch huyền phù lỏng, tiếp theo làm đông lạnh, nghiền và lặp lại nhiều lần, để chuẩn bị các vật liệu thí nghiệm. Kỹ thuật này tạo ra một vật liệu rất đồng nhất nhưng nó đã góp phần làm cho

ADN biến tính, được chỉ ra qua điện di gel. Nghiền và làm tan ADN ở nhiệt độ thấp (4°C) có thể giải quyết một phần vấn đề này. Sau đó chất lượng ADN được cải thiện hơn, hỗn hợp bột khô được lấy để chuẩn bị các vật liệu thí nghiệm cho thế hệ thứ ba [132].

Đồng nhất mẫu trong hexane là một lựa chọn thiết thực đối với hỗn hợp mẫu thông thường. Hơn nữa việc thêm một dung môi hữu cơ vào bột có một thuận lợi đối với dầu chiết, làm cho việc chiết ADN được dễ dàng hơn.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã đem phân tích hai mẫu ngô (1kg) chứa 0,5% và 0,1% (w/w) hạt ngô Mon810. Sau đó kích thích chúng trong 30 phút ở bình 5 lít với 2,5 lít hexane, dung môi được loại bỏ và bột được làm khô qua đêm ở 40°C. Mỗi mẫu được tiến hành tách chiết ADN 10 lần. ADN tổng số được xác định số lượng bằng ánh sáng huỳnh quang và trình tự *CaMV 35S* được xác định số lượng bằng Real Time PCR [131]. Các kết quả cho thấy nghiền tất cả các mẫu đại diện đã phân tích đều đạt tới ngưỡng ban đầu ở chu trình gần như giống nhau. Biến thiên về tỷ lệ % thu được là 24 và 13,2 tương ứng với 0,1 và 0,5% GMOs. Những giá trị này là ở giữa những giá trị đã thu được bởi Trapmann [131] khi kiểm tra các tiêu chuẩn của đậu tương IRCC.

Bảng 24: Sự phát hiện <i>CaMV 35S</i> trong ADN từ bột ngô và bột đậu tương						
Mẫu	Ct	Sd	Số bản sao			
			35S	35S trung bình	Tổng số	% GMO
Ngô 0,1%GMO	34.37	0.52	38.48	44.23	37 000	0.12±0.02
	34.25		40.97			
	33.78		53.24			
Ngô 1%GMO	39.46	0.11	335.91	336.12	37 000	0.91±0.04
	30.57		315.71			
	30.35		356.75			
Đậu Roundup Ready 0,5%	30.64	0.21	303.50	346.63	74 000	0.53±0.05
	39.35		357.41			
	30.24		378.97			

Ct = chu kỳ mà ánh sáng huỳnh quang đã phát ra đạt tới ngưỡng ban đầu đã xác định trong thí nghiệm; *SD* = độ lệch tiêu chuẩn; *35S* = các bản sao của đoạn đã phát hiện theo đường cong tiêu chuẩn; %GMO = Sự định lượng GMO trong mẫu. Để tính toán % này thì lấy 37 000 genome / 100ng ADN ngô và 42ng ADN đậu tương đã được đánh giá (Genome đậu tương là đồng hợp tử đối với gen chuyển -2x, trong khi ngô Mon810

là nửa tiếp hợp -1x). Mẫu ngô đã được chuẩn bị bằng cách trộn ngô Mon810 và bột ngô không chuyển gen theo tỷ lệ thích hợp. ADN từ đậu tương được sử dụng như là chất thêm cũng được phân tích như các ống chưa biết khi khuếch đại để phát hiện 35S.

Các ảnh hưởng tiếp theo đã được làm để cải tiến phương pháp nhằm phát hiện và xác định GMOs trong các hạt ngũ cốc và thực phẩm, khi xét đến các yêu cầu đối với việc thương mại hoá quốc tế và các quy định về an toàn. Ở đây chúng tôi đã đề xuất các môi mồi cho phản ứng PCR thông thường và cho Real Time PCR và thảo luận các phương pháp để điều khiển chất lượng của ADN và đồng nhất các mẫu bột mà có thể có lợi.

Qua thực tế thí nghiệm và các nghiên cứu của nhiều tác giả khác, chúng tôi thấy: phương pháp PCR có độ chính xác khá cao, có thể định tính và định lượng được GMOs. Tuy nhiên, đây là phương pháp không kinh tế, yêu cầu thiết bị hiện đại, kỹ thuật viên có tay nghề cao.

3.4. NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN NHỜ KỸ THUẬT LAI ADN (SOUTHERN BLOT)

Để nhận biết chính xác gen ngoại lai *CryIA(c)* có trong các cây ngô chuyển gen, chúng tôi tiến hành thí nghiệm lai phân tử ADN. Nguyên lý chung là sử dụng một đoạn ADN tương đồng (mẫu dò) để lai với đoạn tương đồng với nó theo nguyên tắc bổ sung. Trong thí nghiệm chúng tôi đã tách gen *CryIA(c)* từ plasmid pART27 để làm mẫu dò. Mẫu dò được biến tính ở nhiệt độ 95°C, trong 5 phút nhằm phá vỡ mối liên kết hydro giữa hai sợi phân tử ADN để tạo thành sợi đơn, đánh dấu mẫu dò bằng bộ kit ECL.

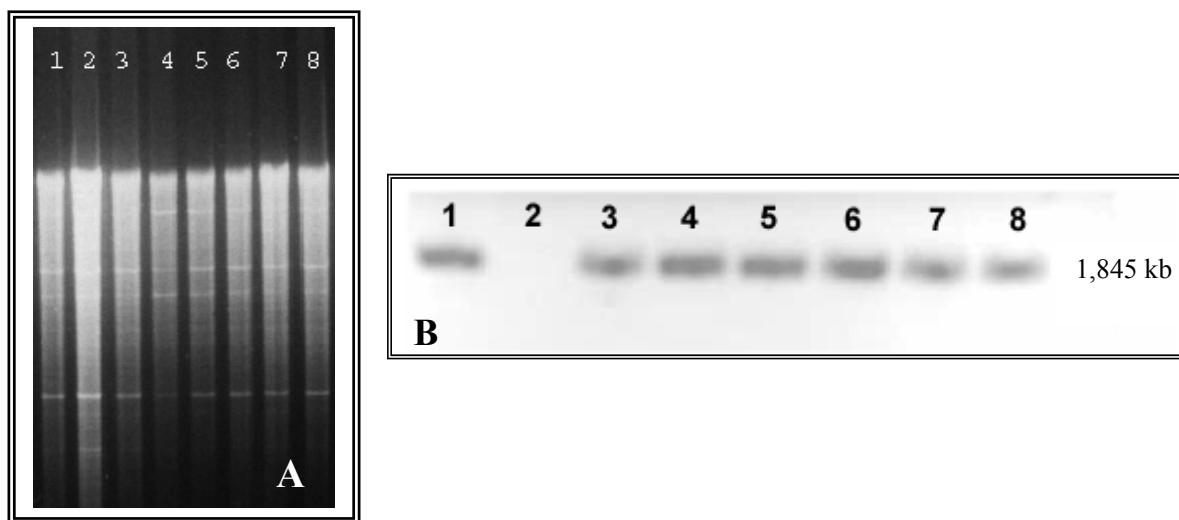
Theo những nghiên cứu trước đây, có hai giả thuyết chính về việc bổ sung mẫu dò vào phản ứng lai, *một là*: tính toán nồng độ ADN mẫu dò theo diện tích màng lai ADN, *hai là*: lượng ADN mẫu dò bổ sung vào phản ứng dựa vào thể tích dung dịch lai. Qua quá trình thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy: nếu bổ sung nồng độ mẫu dò vào dung dịch lai quá thấp phép lai có thể xảy ra, nhưng khi hiện phim để nhận biết băng lai thì không thấy xuất hiện. Mặt khác, nếu nồng độ mẫu dò quá cao việc lai ADN trong dung dịch khó xảy ra. Khi áp dụng giả thuyết 1, phản ứng chỉ đạt kết quả nếu cho 1 - 3 màng lai, và hiệu quả giảm dần nếu sử dụng từ 3 màng lai trở lên. Ngược lại, giả thuyết 2 đã được chúng tôi áp dụng và có hiệu quả với mọi trường hợp. Do vậy, chúng tôi đã sử dụng giả thuyết 1 để tính toán ADN mẫu dò cho thí nghiệm lai ADN của mình.

ADN của cây chuyển gen và cây đối chứng được xử lý với enzyme giới hạn Bgl II, vị trí cắt của enzym này nhận biết 6 cặp bazơ nitơ. Sở dĩ chúng tôi chọn các enzyme

này bởi vì chúng không có điểm cắt trong trình tự của gen ngoại lai (*CryIA(c)*). Khối lượng ADN đem xử lý là 5µg, với thể tích phản ứng là 100µl, với thời gian 1,5-2h.

Sau khi xử lý enzyme, ADN được điện di trên gel agarose 1%. Do ADN của nhân rất lớn nên số đoạn bị cắt bởi enzyme giới hạn rất nhiều, khoảng cách về khối lượng phân tử giữa chúng rất nhỏ. Do vậy sau khi điện di trên gel chúng sẽ tạo thành một dải gồm nhiều mảnh ADN liên tục (smear) (hình 41 A).

Sau khi ADN đã được loại bỏ purin và gel được biến tính in situ, mục đích là để mở xoắn ADN tạo thành mạch đơn. Màng được đem hong khô trong không khí 4 giờ để cố định ADN sợi đơn trên màng. Sau đó ADN được chuyển lên màng nitro cellulose và chúng được lai với mẫu dò đã đánh dấu, nhiệt độ phản ứng xảy ra tốt nhất ở 42°C. Mẫu dò nào có các gốc kiểm bổ sung chính xác với phân tử ADN trên màng thì sẽ ghép đôi để tạo thành sợi xoắn kép (gồm 2 sợi đơn có nguồn gốc khác nhau).



Hình 41: Kết quả xử lý enzym (A) và lai phân tử ADN nhận biết gen *Cry IA(c)* trong cây ngô chuyển gen (B)

Giếng 1: Mẫu đối chứng dương (đoạn gen *Cry IA(c)* tách chiết từ plasmid pART 27)

Giếng 2: Mẫu đối chứng âm (Mẫu của cây không chuyển gen)

Giếng 3 – 8: Mẫu lai ADN của cây ngô chuyển gen

Kết quả lai ADN được phát hiện nhờ hiện phim X quang, hình 41B cho thấy sự xuất hiện băng lai của gen *Cry IA(c)* (1 băng của mẫu đối chứng dương (plasmid pART 27) và 6 băng của mẫu ngô chuyển gen), các băng lai này có

kích thước tương ứng là 1,845kb, trong khi đó ở đối chứng âm thì không có sự xuất hiện của băng lai ADN này (giếng 2 – hình 41).

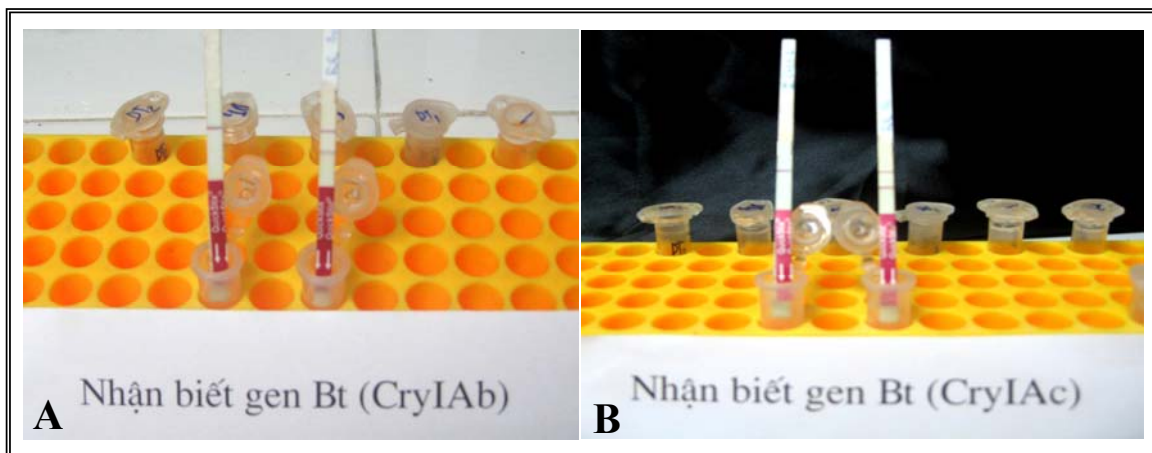
Phương pháp Southern Blot có độ chính xác cao hơn PCR. Nhưng thời gian phân tích dài, quá trình thực hiện phức tạp, chi phí cao, chỉ kiểm tra được định tính các thành phần GMOs.

3.5. KẾT QUẢ NHẬN BIẾT CÂY TRỒNG BIẾN ĐỔI GEN NHỜ SỬ DỤNG QUE THỬ NHANH (QuickStix)

EnviroLogix là công ty đã đưa ra phương pháp thông dụng để nhận biết các giống cây trồng chuyển gen - đây chính là phương pháp sử dụng que thử nhanh QuickStix. Với phương pháp này, người ứng dụng chỉ cần tách chiết mẫu với nước hoặc dung dịch đệm, rồi nhúng que thử vào ống đựng mẫu đó và đợi đọc kết quả. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ đạt hiệu quả khi sử dụng với quy trình và bộ kit của hãng và các bộ kit đó được thiết kế chỉ để phân tích ở mức định tính.

Trong thử nghiệm này chúng tôi đã sử dụng phương pháp này và 2 bộ kit của hãng EnviroLogix để tiến hành nhận biết gen *Cry IA(c)* có trong ngô chuyển gen (nhờ sử dụng bộ kit QuickStix™ *Cry IA(b)/Cry IA(c)*) và gen *EPSPS* có trong đậu tương chuyển gen (nhờ sử dụng bộ kit QuickStix™ Roundup Ready®).

Đối với mẫu hạt ngô sau khi được nghiền nhỏ, bổ sung dịch chiết vào ống đựng bột nghiền và đặt que thử vào trong ống chứa dịch tách chiết, khoảng 5 phút thì kiểm tra kết quả.



Hình 42: Kết quả nhận biết protein Cry IA(b) (A) và Cry IA(c) (B) có trong giống ngô Bt nhờ sử dụng que thử nhanh

Kết quả thu được ở hình 42 cho thấy: ở ống chứa dịch tách chiết của hạt ngô không chuyển gen thì chỉ thấy xuất hiện một vạch màu trên dải băng (cho kết quả âm tính), trong khi ở ống chứa hạt ngô Bt lại có 2 vạch màu (cho kết quả dương tính).

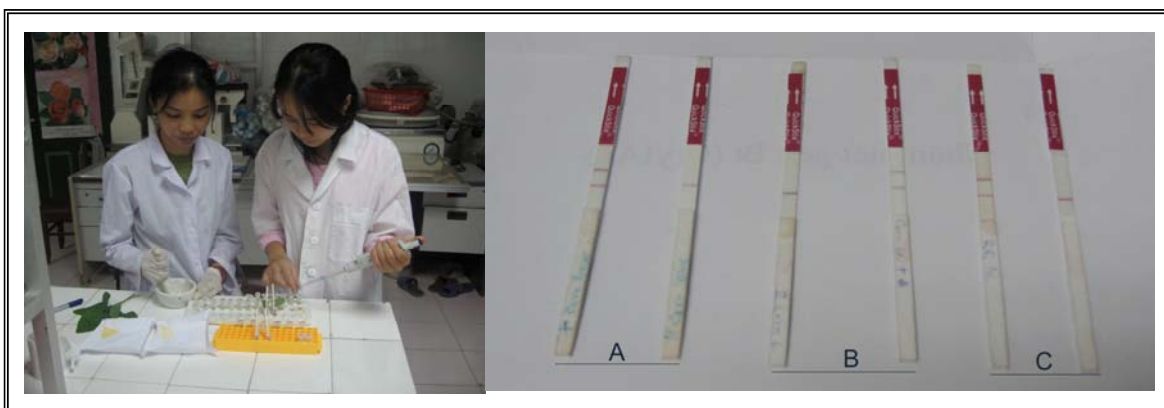
Kết quả dương tính trong mẫu ngô Bt cho thấy sự biểu hiện của Protein *CryIA(b)* và *CryIA(c)* có trong giống ngô chuyển gen đã thí nghiệm (Hình 42).

Với mẫu lá đậu tương chuyển gen, chúng tôi cũng đã thu được kết quả dương tính ở ống có chứa dịch chiết mô lá đậu tương Roundup Ready với sự xuất hiện của 2 vạch băng trên dải. Kết quả này đã cho thấy sự biểu hiện của protein *EPSPS* trong đậu tương Roundup Ready. Trong khi mẫu đối chứng (mẫu đậu tương không chuyển gen) thì chỉ có 1 vạch băng xuất hiện. Kết quả âm tính này cho thấy không có sự biểu hiện của protein *EPSPS* trong mẫu đối chứng.



Hình 43: Kết quả biểu hiện của protein EPSPS trong đậu tương Roundup Ready nhờ sử dụng que thử nhanh

Qua các thử nghiệm đã tiến hành, chúng tôi thấy phương pháp sử dụng que thử miễn dịch ELISA này là phương pháp nhanh, kinh tế, thích hợp với việc sàng lọc ban đầu. Tuy nhiên nó lại chỉ đặc hiệu với một số ít đối tượng, chẳng hạn như chỉ đặc hiệu khi nhận biết nội độc tố biểu hiện bởi *Bacillus thuringensis* (*Cry IA(b)*, *Cry IA(c)* có trong ngô chuyển gen) và protein *CP4-EPSPS* (có trong một số dòng chuyển gen như đậu tương, cải dầu,...).



Hình 44: Thí nghiệm nhận biết GMOs nhờ sử dụng kỹ thuật que thử miễn dịch ELISA

Ngoài ra, hãng EnviroLogix còn có một số bộ kit khác dùng để nhận biết cây trồng chuyển gen nhờ sử dụng que thử QuickStix. Sau đây là danh sách các bộ kit của EnviroLogix ứng dụng để nhận biết một số cây trồng chuyển gen:

Bảng 25: Một số cây trồng chuyển gen được nhận biết nhờ que thử QuickStix (EnviroLogix)

Đối tượng	Mẫu Thí nghiệm	Số hiệu bộ Kit	Tên thương mại	Gen phân tích	Thời gian đọc kết quả	Giới hạn nhận biết
Lúa	Hạt thóc	AS 013 RB	LibertyLink	<i>PAT/bar</i>	10 phút	1.33% (Dòng lúa LL601) 0.02% (Dòng lúa LL62)
Bông	Hạt	AS 016 AP		<i>Cry 1F</i>	10 phút	1%
Bông	Hạt	AS 005 AP	Bollgard II	<i>Cry 2A</i>	10 phút	0,25%
Bông	Hạt	AS 011 AP	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	10 phút	0,25%
Bông	Hạt	AS 013 AP	LibertyLink	<i>PAT/bar</i>	10 phút	0,25%
Bông	Hạt	AS 003 AP	Bollgard	<i>Cry 1Ac</i>	10 phút	0,5%
Ngô	Hạt, mô lá	AS 037 LT ; AS 037 BG	Agrisure RW	<i>Cry 3A đã cải biến</i>	5 phút	5 – 10.10 ⁻⁷ % (mô lá), 0.75% (hạt)
Bông	Mô cây, hạt	AS 003 CTLS	Bollgard	<i>Cry 1Ac</i>	10 phút	5-10.10 ⁻⁷ %
Đậu tương	Hạt	AS 010 BGB (AS 065 BGBR in Brasil)	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	0,1%
Đậu tương	Mô lá	AS 010 LS	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>CP4 EPSPS</i>
Ngô	Hạt	AS 036 TC	Roundup Ready, YieldGard CB, YieldGard CRW,	<i>Cry 1Ab/Bt11</i> , <i>Cry 9C</i> ,	5 phút	0,01 – 1%

			Starlink, LibertyLink, Herculex I, Herculex RW	<i>Event 603, Cry 3Bb, Cry 1F, T25, Cry34</i>		
Ngô	Hạt, bột	AS 003 BG	YieldGard Corn Borer - Mon810 and Bt11	<i>Cry 1Ab</i>	2-5 phút	1% (5 phút); 2% (2 phút)
Ngô	Mô cây, hạt	AS 003 CRLS	YieldGard Corn Borer - Mon810 and Bt1; Naturegard, Knockout - Bt176	<i>Cry 1Ab</i>	10 phút	5 - 10.10 ⁻⁷ %
Ngô	Mô lá, hạt	AS 016 BG, AS 016 LS	Herculex I	<i>Cry 1F</i>	5 phút	0,5%
Bông	Mô lá, hạt	AS 005	Bollgard II	<i>Cry 2Aa, Cry 2Ab</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 2Aa, Cry 2Ab</i>
Ngô	Mô cây, hạt	AS 015	YieldGard, YieldGard Plus, YieldGard VT	<i>Cry 3Bb</i>	5 phút	0,5%
Ngô	Mô lá, hạt, bột	AS 008	StarLink	<i>Cry 9C</i>	5-10 phút	0,125%
Ngô	Mô lá, hạt	AS 054 BG, AS 054 LS	HERCULEX™ RW	<i>Cry 34Ab1</i>	5 phút	0,5%
Bông	Mô lá, hạt	AS 013 LS	LibertyLink	<i>PAT/bar</i>	10 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>PAT/bar</i>
Ngô	Mô lá, hạt	AS 014	LibertyLink	<i>PAT/pat</i>	5 phút	1%
Ngô	Hạt	AS 010 BG	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	0,5%
Ngô	Mô lá, hạt	AS 010 LS	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>CP4 EPSPS</i>
Bông	Mô lá, hạt	AS 011 LS	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>CP4 EPSPS</i>
Cải dầu	Mô lá, hạt	AS 017 LS	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>CP4 EPSPS</i>
Củ cải đường	Hạt	AS 010 SB	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút	0,1%
Cỏ linh lăng	Mô lá, hạt, cỏ khô	AS 045	Roundup Ready	<i>CP4 EPSPS</i>	5 phút (mẫu lá hoặc cỏ khô); 15 phút (hạt)	0,16% (hạt) 0,5% (cỏ khô)
Bông	Mô lá, hạt	AS 012 LS	Bollgard II	<i>Cry 1Ac, Cry 2A</i>	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 1Ac, Cry 2A</i>
Bông	Hạt	AS 034 ST	Bollgard, Roundup Ready	<i>Cry 1Ac, CP4 EPSPS</i>	10 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 1Ac, CP4</i>

						<i>EPSPS</i>
Bông	Hạt	AS 046 ST	Bollgard II, Roundup Ready	Cry 1Ac, Cry 2A, CP4 EPSPS	10 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 1Ac</i> , <i>Cry</i> <i>2A</i> , <i>CP4 EPSPS</i>
Bông	Hạt	AS 047 ST	LibertyLink	Cry 1Ac, Cry 2A, PAT/bar	10 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 1Ac</i> , <i>Cry</i> <i>2A</i> , <i>PAT/bar</i>
Ngô	Mô lá	AS 038 LS	YieldGard Plus	Cry 1Ab, Cry 3Bb	5 phút	Có sự xuất hiện của protein <i>Cry 1Ab</i> , <i>Cry</i> <i>3Bb</i>

3.6. KẾT QUẢ ĐỌC TRÌNH TỰ MỘT SỐ GEN ĐÃ ĐƯỢC BIẾN NẠP VÀO GMOs

Hiện nay, hầu hết các thực vật chuyển gen đều có chứa trình tự khởi động CaMV 35S (small subunits of cauliflower mosaic virus) của virus khảm súp lơ và đoạn kết thúc T-NOS (Nopaline synthase) của Ti-plasmid từ vi khuẩn Agrobacterium, và trình tự mã hoá của chính gen được chuyển. Đoạn CaMV 35S và T-NOS là những trình tự quan trọng đối với sự biểu hiện của các gen ngoại lai trong thực vật.

Các cây trồng biến đổi gen hiện nay chủ yếu mang gen kháng sâu, mà thường là gen Bt – là tinh thể độc tố của vi khuẩn Bacillus thuringiensis. Tinh thể độc tố này có nhiều nhóm khác nhau như Cry I, Cry II, Cry III... Tuy nhiên khi ứng dụng các nhóm độc tố này để tạo khả năng kháng sâu cho cây trồng thì mới chỉ có các vectơ mang trình tự mã hóa cho tiền độc tố Cry IA(a), Cry IA(b), Cry IA(c). Và vectơ có vùng gen cấu trúc Cry IA(b) đã được chuyển vào rất nhiều loại cây trồng, đặc biệt là các giống ngô.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đọc trình tự của 3 đoạn gen đó là gen Bt, đoạn CaMV 35S, T-NOS. Sản phẩm PCR của các gen này được tinh sạch nhờ xử lý riêng rẽ với ammonium acetate 4M và cồn 100% để loại bỏ môi và các nucleotit dư thừa sau phản ứng. Sau đó kết tủa thu sản phẩm PCR và hoà tan với TE để dùng làm khuôn để giải trình tự. Xác định trình tự ADN được tiến hành theo Protocol sử dụng bộ kit xác định trình tự Bigdye của Applied Biosystems (8 µl Big dye (đã pha loãng từ stock với tỷ lệ 1:3); 4µl Buffer 2,5X; 5 µl môi (0,8 pmol/µl; sản phẩm PCR: 2 µl (T-NOS), 3 µl (CaMV 35S), 2,5 µl (Bt); H₂O deion khử trùng vừa đủ với thể tích phản ứng là 20 µl). Chạy với chu trình

nhiệt: 95 °C trong 1 phút; 25 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây; 50 °C trong 20 giây và 60 °C trong 4 phút. Sau đó biến tính với Hi Di Formamide (10 µl) ở 90 °C trong 3 phút và cho vào máy sequencing.

Kết quả đã giải trình tự được các đoạn sau:

- Đoạn promoter *CaMV* 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ. Trình tự *CaMV* 35S dài 195 bp (hình 45).

ggcactacaaatgccatcattgcgataaaaggaaaggctatcggttcaagatgcctctgcccagac
agtgggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaac
cacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggat**tgacgcacaat**
cccactatc

Hình 45: Trình tự đặc trưng của *CaMV* 35S

- Đoạn *T-NOS* (nopaline synthase terminator) có nguồn gốc từ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Đoạn terminator này đã được chuyển vào ngô chuyển gen và đã được phân tách ra để giải trình tự. Đoạn trình tự này dài 192 bp (hình 46).

ctttcgggagcgattcatccttcccgaacgcagcatacaactccccgttgtactgccc
tcttcaagtgtgcttcttcccccttctcccccttaccacggcaagtccttgggaaata
actccgatgggcagaaaaaagaaggggttagagaccctcctggcccaacccta**cgggc**
aacaggattcaatcttaa

Hình 46: Trình tự đặc trưng của *T-NOS*

- Gen *Bt* có nguồn gốc từ *Bacillus thuringiensis*. Gen này đã được chuyển vào dòng ngô 176 và được phân tách để đọc trình tự kích thước 420 bp.

cggccccgagttcaccttccccctgtacggcaccatgggcaacgctgcacctc
agcagcgcacatcgtgccacagctggggccaggagtgtagccgacccctgagcagc
accctgtaccgtcgacctttcaacatcggcatcaacaaccagcagctgagcgt
gctggacggcaccgagttcgccctacggcaccagcagcaacctccccagcgcgg
tgtaccgcaagagcggcaccgtggacagcctggacgagatccccctcagaac
aacaacgtgccacctcgacagggcttcatccaccgtctgagccacgtgagcat
gttccgcagtggttcagcaacagcagcgtgagcatcatccgtgcacctatgt
tcagctggattcacccgagtgccgagtt**caacaacatcatccccagcag**

Hình 47: Trình tự đặc trưng của gen *Bt-CryIA(b)*

3.7. KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THIẾT KẾ PHẦN MỀM CHUYÊN BIỆT ĐỂ QUẢN LÝ GMOs

3.7.1. Phần mềm quản lý GMOs

Hệ thống cơ sở dữ liệu GMOs và phần mềm quản lý đã đưa lên mạng internet bao gồm hai thành phần chính:

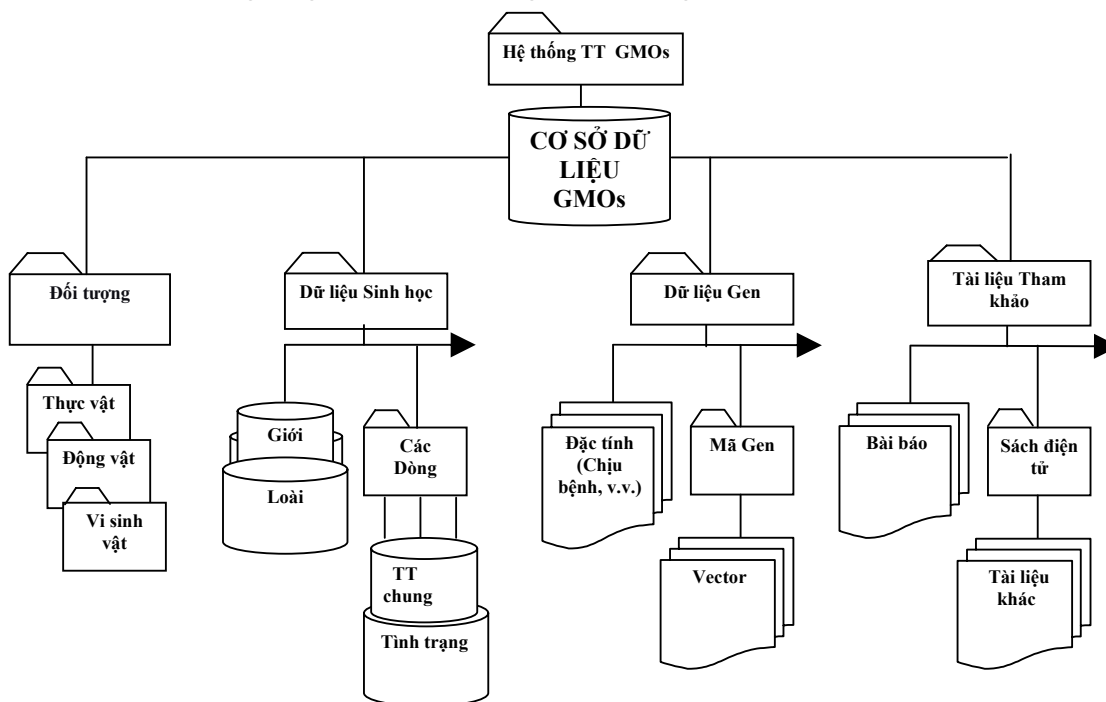
- Hệ thống cơ sở dữ liệu về GMOs nhằm tích trữ dữ liệu các cây trồng biến đổi gen (GMCs), đặc biệt cung cấp các thông tin cấu trúc gen của GMCs và các dữ liệu liên quan kể cả tài liệu tham khảo như các bài báo, sách điện tử, v.v. Cơ sở dữ liệu về GMOs tích hợp trong Website cùng với phần mềm cơ sở của CSDL (Microsoft SQL Server 2000 Enterprise Edition). Microsoft SQL Server 2000 cho phép kiểm soát và quản lý số lượng máy tính trong Viện Di truyền Nông nghiệp có thể truy cập, cập nhập và chỉnh sửa dữ liệu GMOs.

- Phần mềm quản lý này bao gồm các module giao diện với người quản trị như nhập xuất, tìm kiếm, bảo trì, xử lý thống kê và hiển thị dữ liệu. Phần mềm quản lý CSDL được cài đặt ở cả máy chủ và các máy tính trong mạng quản lý CSDL.

Hệ thống Cơ sở dữ liệu về GMOs đã được thiết kế và xây dựng trên cơ sở Microsoft SQL Server 2000 và hệ điều hành Windows Server 2000, còn phần mềm quản lý trên cơ sở Microsoft Visual Studio.NET 2003 trên nền hệ điều hành Windows XP.

Phần mềm quản lý GMOs có 3 công cụ, chức năng chính đó là: nhập dữ liệu, tìm kiếm và danh mục.

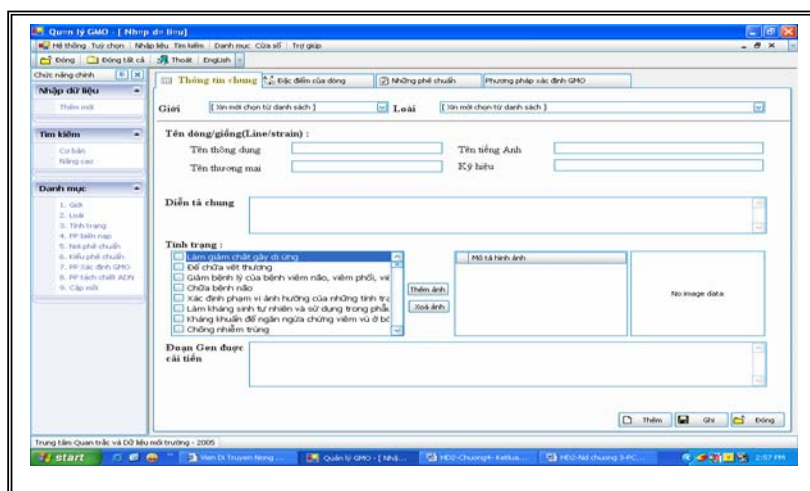
Phần mềm bao gồm hệ thống cơ sở dữ liệu về sinh vật biến đổi gen trên thế giới và Việt Nam, với tổng số gần 300 đối tượng được thống kê.



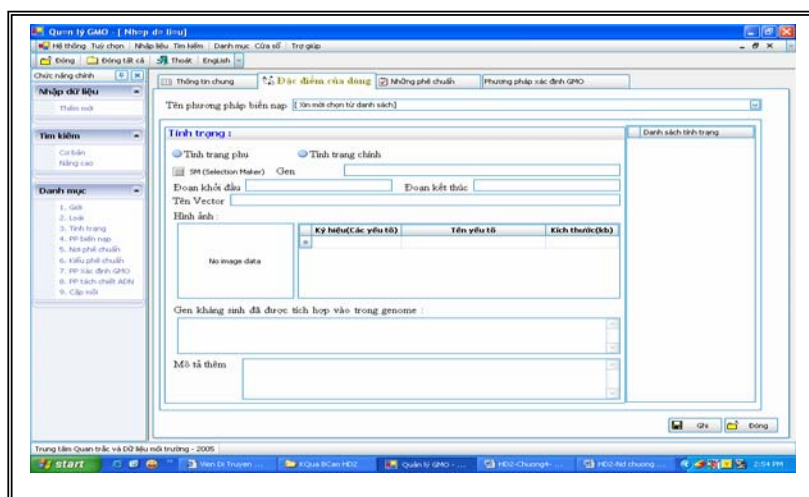
Hình 48: Cấu trúc tổng thể của Cơ sở dữ liệu về GMOs và các thành phần dữ liệu

Các chức năng chính của phần mềm:

- ♦ Chức năng nhập dữ liệu bao gồm 4 trường: Thông tin chung, Đặc điểm của dòng, Những phê chuẩn và Phương pháp xác định GMOs (hình 49, 50)

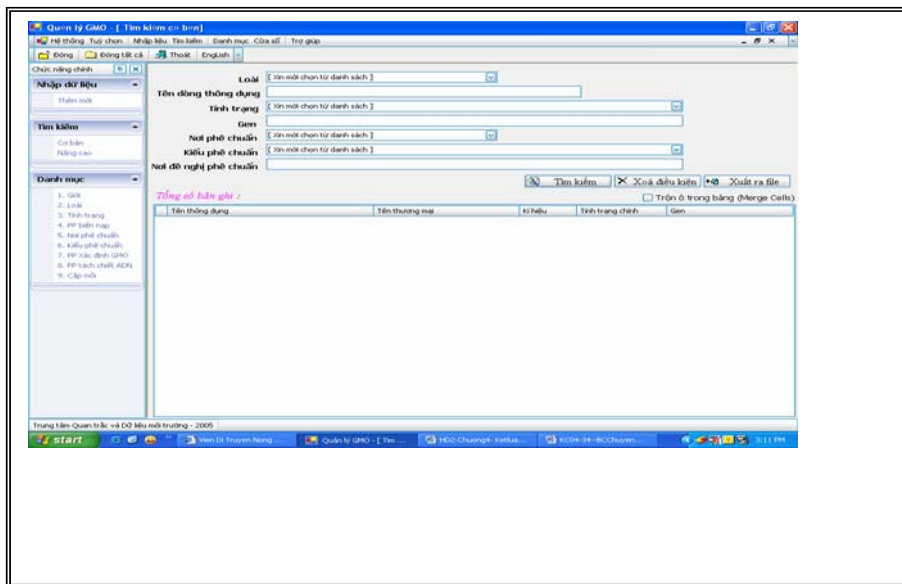


Hình 49: Giao diện chỉnh sửa dữ liệu thông tin chung



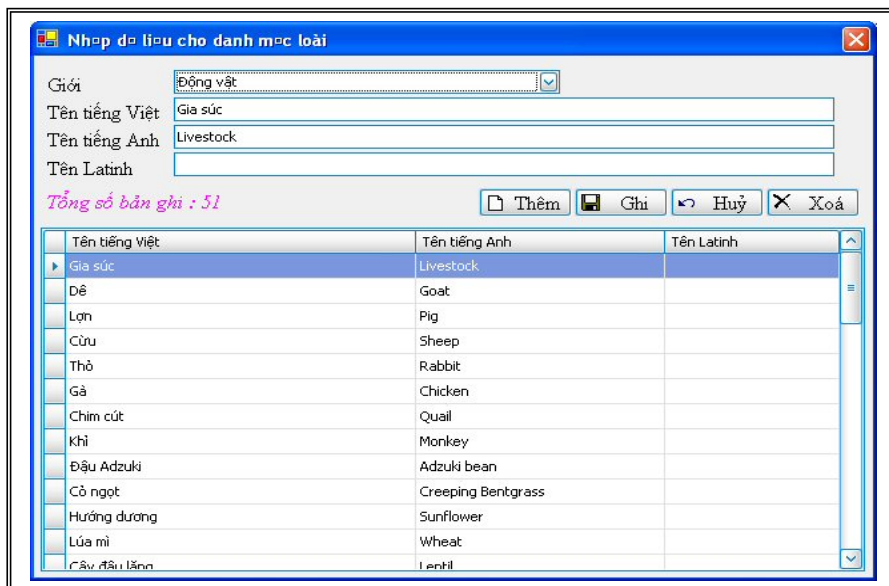
Hình 50: Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về đặc điểm của dòng

- ♦ Chức năng tìm kiếm bao gồm :tìm kiếm cơ bản và tìm kiếm nâng cao (hình 51). Ta có thể tìm kiếm theo: loài, tên dòng thông dụng, tính trạng, gen, nơi phê chuẩn, Kiểu phê chuẩn, nơi đề nghị phê chuẩn.

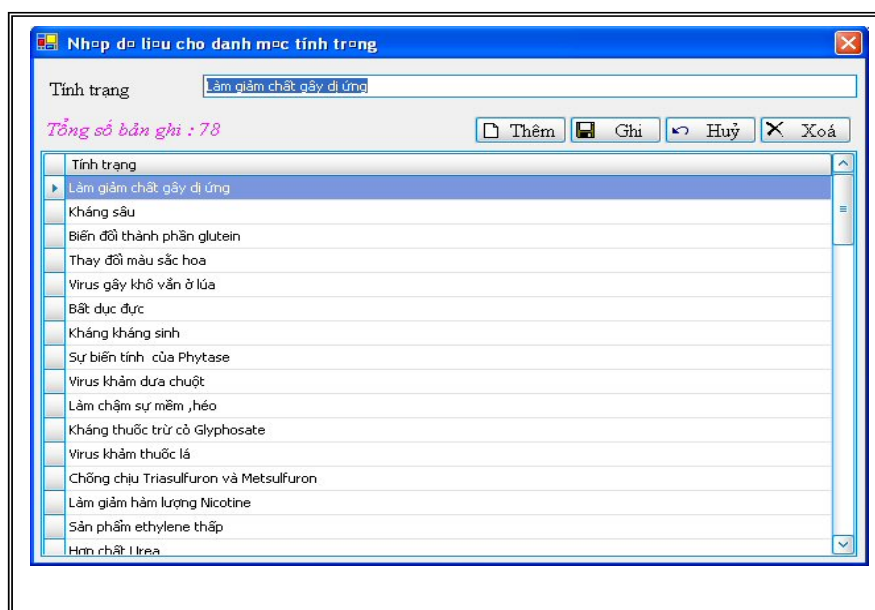


Hình 51: Giao diện tìm kiếm dữ liệu cơ bản

♦ Danh mục bao gồm 9 giao diện đó là: giao diện chỉnh sửa dữ liệu về giới, loài, tính trạng, phương pháp biến nạp, nơi phê chuẩn, kiểu phê chuẩn, phương pháp xác định GMO, phương pháp tách chiết ADN, và giao diện chỉnh sửa dữ liệu về cấp môi (hình 52, 53).



Hình 52: Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về loài

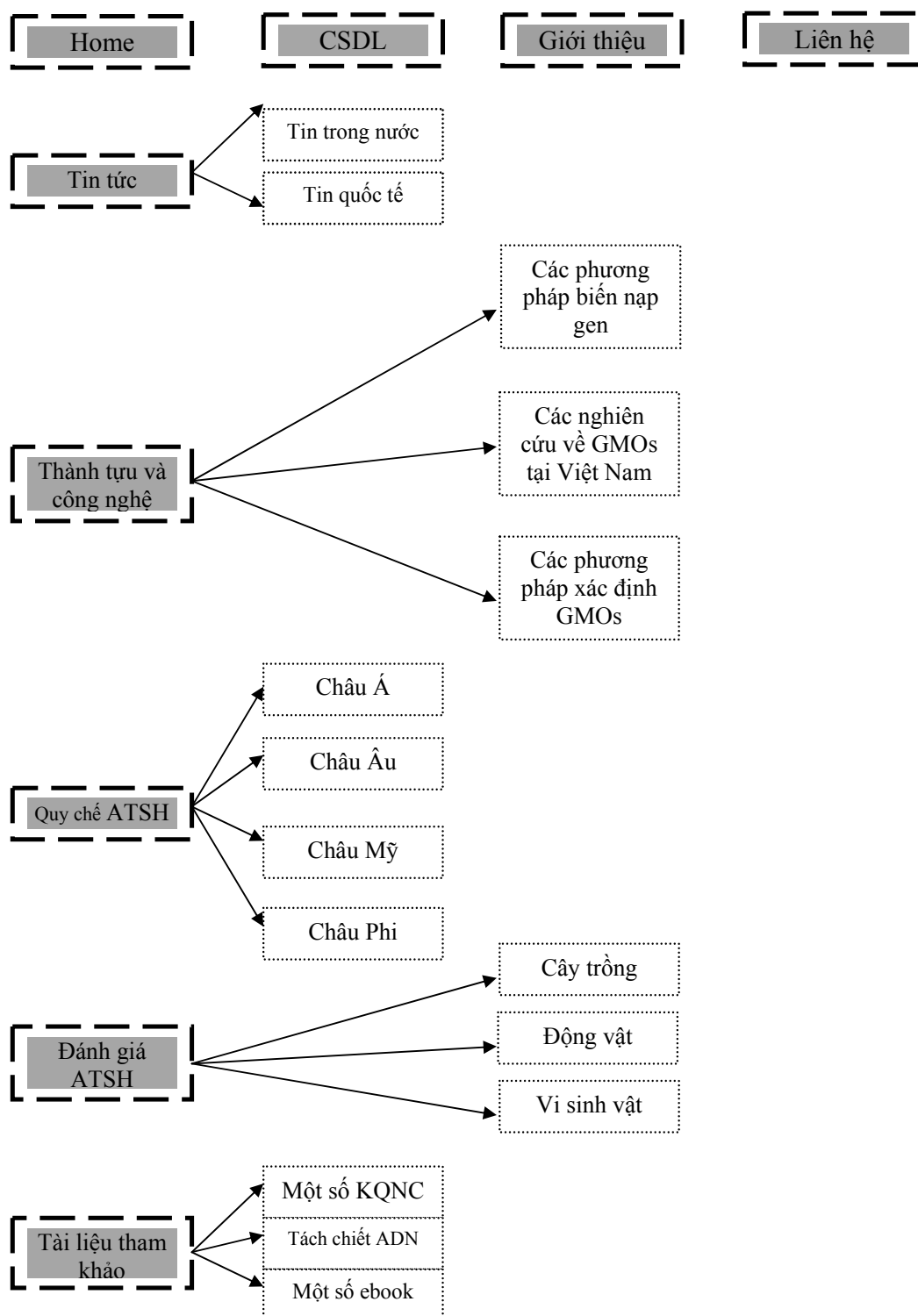


Hình 53: Giao diện chỉnh sửa dữ liệu về tính trạng

3.7.2. Website cung cấp thông tin về GMOs

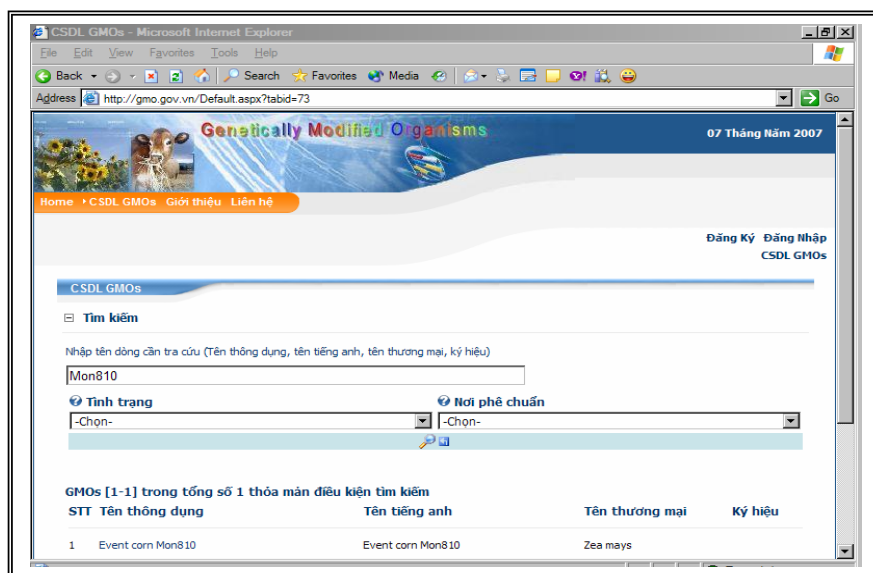
Website được đăng ký chính thức với tên miền là <http://www.gmo.gov.vn> tại Trung tâm Internet Việt Nam (VNIC). Tính đến ngày 16/8/2007 đã có 11.111 lượt người truy cập vào website.

♦ Cấu trúc website:





Hình 54: Trang chủ



Hình 55: Cơ sở dữ liệu GMOs

♦ Thông tin trong cơ sở dữ liệu bao gồm:

- Tên loài
- Tên giống/chủng
- Thông tin chung về đối tượng được chuyển gen
- Tình trạng mới được tạo ra
- Hình ảnh vector
- Thành phần vector
- Thông tin về tình trạng phê chuẩn của các quốc gia
- Tên phương pháp để xác định GMOs

- Tên và trình tự cấp mỗi

Cơ sở dữ liệu (CSDL) gồm có 132 đối tượng đó được chuyển gen trên thế giới và Việt Nam bao gồm:

Thực vật	Động vật	Vì sinh vật
Đậu tương	Dê	<i>E.coli DH5α</i>
Đậu Adzuki	Chuột	<i>E.coli JM109</i>
Dưa hấu	Bò	<i>E.coli CC118</i>
Dưa chuột	Lợn	<i>E.coli BL21</i>
Súp lơ	Cừu	<i>E.coli MM294 và MC1061</i>
Cải dầu	Thỏ	<i>E.coli HB101 hoặc DH5α</i>
Lúa	Gà	<i>E.coli W 3110</i>
Cắm chướng	Cá chạch	<i>E.coli K-12</i>
Bông	Cá chép	<i>E.coli MG1655</i>
Lanh	Cá hồi	<i>E.coli NBRP</i>
Đu đủ	Cá trắm cỏ	<i>E.coli DS2,DS2-2</i>
Thuốc lá cảnh	Cá vàng	<i>E.coli BAC6010</i>
Rau diếp xoăn	Cá chạch cát lớn	<i>E.coli tuýp 55</i>
Hoa cúc	Cá chó miền bắc	<i>E.coli M15</i>
Ngô	Cá hồi đốm đen	<i>E.coli IKB1</i>
Bí ngô	Cá hồi bạc	<i>E.coli O55B5</i>
Khoai tây	Cá hồi đại dương	<i>E.coli BJ5183</i>
Củ cải đường	Cá hồi chấm hồng	<i>Pseudomonas paueimobilis</i>
Ốt ngọt	Cá trê	<i>Pseudomonas ppY101LA</i>
Thuốc lá	Cá tráp vàng	<i>Pseudomonas peusodoalcaligens</i>
Cà chua	Cá nheo Mỹ	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Lúa mì	Cá hồng	<i>Pseudomonas cepacia G4 5223PR1</i>
Torenia	Cá rô phi Hornorum	<i>Pseudomonas putida F1</i>
Hướng dương	Cá rô phi sông Nin	<i>Pseudomonas fluorescens F113pcb</i>
Mía	Cá vền biển bạc	<i>Pseudomonas putida KT2442</i>
		<i>Pseudomonas spB13 FR1</i>
		<i>Pseudomonas putida pp0301</i>
		<i>Pseudomonas paucimobilis IGP4</i>
		Adenovirus tuýp 5 nhóm C
		Virut làm suy giảm bệnh đậu mùa dòng Ankara
		<i>Salmonella enterica</i> dòng Dublin và dòng Typhimurium
		<i>Pichia pastoris</i> dòng GS115
		<i>Baccillus</i> dòng 168
		<i>Ralstonia solanacearum</i> dòng GMI8172
		<i>Ralstonia solanacearum</i> YN5
		<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> dòng BR11281
		<i>Comamonas testosteroni</i> VP44

♦ Quy chế An toàn sinh học:

Châu Á	Ấn Độ	Guidelines for generating pre-clinical and clinical data for rDNA vaccines, diagnostics and other biologicals, 1999
		Recombinant DNA safety guidelines, 1990
		The indian recombinant DNA safety guidelines and regulations
		Rules for the manufacture, use, import, export and storage of hazardous micro organisms, genetically engineered organisms or cells
	Australia	Handbook on the Regulation of Gene Technology in Australia
		Gene Technology Act 2001
	Campuchia	National Biosafety Framework
		Law on Environmental Protection
	Hàn Quốc	National Biosafety Framework (NBF) of Republic of Korea
	Indonesia	National Biosafety Framework of the public of Indonesia
		Provisions on Biosafety of Genetically Engineered Agricultural Biotechnology
		Regulation Regarding Safety of Living Organisms and Foods of Biotechnological Products Produced through Genetic Engineering
	Lào	Laos National Biosafety Framework
		Laos Environmental Protection Law
	Malaixia	Guideline for the Release of GMOs into the Environment
	Myanmar	National Biosafety Framework Myanmar
	Nhật Bản	Guidelines for Application of Recombinant DNA Organisms in Agriculture, Forestry, Fisheries, The Food Industry and Other Related Industries- Ministry of agriculture, forestry and fisheries government of Japan
	Philippine	Philippine biosafety guidelines Rules and regulations for the importation and release into the environment of plants and plant products derived from the use of modern biotechnology
		Guidelines for Planned Release of Genetically Manipulated Organisms GMOs and Potentially Harmful Exotic Species
	Singapore	Singapore Occupational Health and Safety Guidelines for Laboratories and Production facilities in the Biomedical Sciences
		Singapore Biological Agents and Toxins Act
		Singapore Biosafety Guidelines for research on GMOs
		Singapore Guidelines on the Care Use of Animals for Scientific Purposes
		Singapore Guidelines on the Release of Agriculture

		Related GMOs
		Singapore Interim technical guidelines for biosafety WHO Laboratory Biosafety Manual
	Srilanka	The Gazette of the Democratic Socialist Republic of Sri Lanka
	Thái Lan	Thailand Biosafety Guidelines in Genetic Engineering and Biotechnology for Field Work and Planned Release
		Thailand Biosafety Guidelines in Genetic Engineering and Biotechnology for Laboratory Work
		Thailand Draft Guidelines on Contained Uses of GMOs
	Trung Quốc	China Administrative Measures of Inspection and Quarantine on Entry Exit GM Products Decree
		China Implementation Regulations on Labeling of Agricultural GMOs
		China Implementation Regulations on Safety Assessment of Agricultural GMOs
		China Implementation Regulations on the Safety of Import of Agricultural GMOs
		China Regulations on Safety of Agricultural GMOs
		China Safety Administration Implementation Regulation on Agricultural GMOs
		China Safety Administration Regulation on Genetic Engineering
	Việt Nam	Regulation on field trials, risk management and issue of biosafety license of genetically modified crops
	Bangladesh	National Biosafety Framework of the Government of the People's Republic of Bangladesh
Châu Phi	Cameroon	Explanation and comments on the Cameroon biosafety law
		Law to lay down safety regulations governing modern biotechnology in Cameroon
	Ghana	Ghana biosafety bill
		Draft of a bill entitled biosafety act, 2004
		National biosafety framework for Ghana
		Guidelines on Public Participation, Information Sharing and Access to Justice with Respect to Genetically Modified Organisms
	Kenya	Guidelines for risk assessment of genetically modified organisms in Ghana
		An Act of Parliament to regulate biotechnology and biosafety matters and for connected purposes
	Nigeria	Comments on Nigerian biosafety act 2006
	Nam Phi	Critical analysis of south africa's labelling regulations for genetically modified food, feed and products derived from gm-fed animals
	Uganda	A manual on transboundary movement of GMO's into Uganda

		A manual on the protection confidential business information in Uganda
Châu Mỹ	Mỹ	Coordinated framework for regulation of biotechnology
		Guidance for industry: use of antibiotic resistance marker genes in transgenic plants
		Issues in the regulation of genetically engineered plants an animals
	Ác hen ti na	Analysis of a national biosafety system regulatory policies and procedure in Argentina
Châu Âu		The Directive 2001/18/CE
		The regulation 1829/2003/CE
		The EU Directive 90/219/CE
		The Directive 2002/81/EC
		The EU Directive 90/220/EEC
		The Regulation 1642/2003

♦ Tài liệu tham khảo

❖ Một số kết quả nghiên cứu của đề tài

1. Nghiên cứu lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa LC93-1
2. Nghiên cứu lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa dự chiêm
3. Kết quả nhận biết cây trồng biến đổi gen nhờ sử dụng que thử nhanh Quickstix
4. Kết quả nhận biết đoạn promoter *CaMV35S*
5. Kết quả nhận biết đoạn terminator *NOS*
6. Kết quả nhận biết đoạn một trong số các gen kháng thuốc trừ cỏ (*PAT*) của cây trồng biến đổi gen.
7. Kết quả phát hiện một số đoạn đặc trưng trong gen *CryIA(b)*
8. Kiểm định một số cây trồng biến đổi gen
9. Nhận biết cây trồng biến đổi gen nhờ kỹ thuật lai ADN
10. Phát hiện cây trồng biến đổi gen nhờ phản ứng Multiplex PCR
11. Phát hiện cây trồng biến đổi gen nhờ phản ứng Real-time PCR

❖ *Tách chiết ADN*

- Phương pháp phenol/ chloform
- Phương pháp PVP
- Phương pháp CTAB
- Phương pháp Silica
- Phương pháp guanidine - chloroform

❖ *Một số ebook về sinh vật biến đổi gen và sinh học phân tử*

1. Transgenic mouse – Method and protocols

Edited by: Marten h.Hofker ; Jan van Deursen

Publisher: Human Press

2. E.coli gene expression protocols

Edited by: Peter E. Vaillancourt

Publisher: Human Press

3. Plant biotechnology and transgenic plants

Edited by: Kirsi – Maria Oksman – Caldentey – Wolfgang H. Barz

Publisher: Marcel Dekker, Inc

4. Principle of Biochemistry (Fourth edition)

Edited by: David L.Nelson; Micheal M.Cox

5. Molecular cell Biology

Edited by: Lodish; Berk; Matsudaira; Kaiser; Krieger; Scott; Zipursky; Darnell

6. Stem cell biology and gene therapy

Edited by: Peter.J.Quesenberry; Gary S.Stein; Bernard G.Forget; Sherman

7. Molecular and cell biology

Edited by: William D.Stansfield; Jaime S.Colomô; Raul J.Cano

Publisher: McGRAW- HILL

8. Biosafety and risk assessment in agricultural biotechnology

Institute of International Agriculture

Michigan State University, USA

9. Field testing genetically modified organisms: framework for decisions

Publisher: National academy press

10. Genetically modified and cloned animals. All in a good cause?

A report by Genewatch UK

Edited by: Jay Rutovitz and Sue Mayer

11. Plant gene transfer and expression protocols

Edited by: H.Jones

Publisher: Humana Press

12. Transgenesis techniques- principles and protocols (second edition)

Edited by: Alan R.Clarke

Publisher:Humana Press

13. Transgenic plants-Methods and Protocols

Edited by: Leandro Pena

Publisher: Humana Press

14. Biosafety regulation: The Cartagena protocol

Edited by: Ezra Ricci

15. Transfer of DNA from genetically modified organisms _

Truy cập trang web <http://gmo.gov.vn> để biết thêm thông tin chi tiết.

3.8. Các giải pháp quản lý một số sinh vật biến đổi gen có triển vọng và cảnh báo những rủi ro tiềm ẩn

Ngày nay sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm công nghệ sinh học có mặt rộng rãi trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe con người như insulin, vacxin viêm gan B, thuốc chữa bệnh tim mạch... hoặc cho mục đích công nghiệp. Tuy nhiên, một số khủng hoảng có liên quan đến thực phẩm trong những năm gần đây đã làm cho người tiêu dùng quan tâm đặc biệt đến vấn đề an toàn thực phẩm. Nỗi lo sợ về độ an toàn của thực phẩm đang ngày một lớn, đặc biệt là khi Anh và một số nước Châu Âu khác phát hiện ra hoá chất rửa phim điện não đồ dạng xốp ở trâu bò và chất ô nhiễm Dioxin ở các sản phẩm gia cầm tại Bỉ đã làm cho người tiêu dùng giảm lòng tin đối với ngành công nghệ thực phẩm. Để cải thiện tình trạng này thì các nhà sản xuất cần phải xem xét một cách nghiêm túc về tính an toàn của sản phẩm. Mức độ an toàn của thực phẩm chuyển gen ít nhất cũng tương đương với thực phẩm khác bởi vì quá trình đánh giá an toàn đối với thực phẩm chuyển gen kỹ lưỡng hơn nhiều so với 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”(Tổ chức lương thực thực phẩm Úc-New Zealand, 2000).

Vào tháng 9/2000, một bài báo của Mỹ đã thông báo rằng ngô StarLink™ đã được tìm thấy trong Taco Shells ở các cửa hàng thực phẩm Mỹ. Loại sản phẩm của ngô chuyển gen này được thương mại bởi Aventis và được phê chuẩn bởi cơ quan bảo vệ

môi trường của Mỹ (EPA) để làm thức ăn gia súc nhưng không sử dụng làm thực phẩm cho người. Việc phê chuẩn làm thức ăn gia súc đã được công nhận và chắc chắn rằng loại ngô này chỉ được trồng cho mục đích làm thức ăn gia súc. Việc phê chuẩn để sử dụng làm thực phẩm không được công nhận bởi vì chưa giải quyết được những lo lắng rằng protein *Cry9C* có thể gây dị ứng.

Các sản phẩm chuyển gen đã và đang phát triển một cách nhanh chóng trên toàn cầu. Mặc dù ngày càng có nhiều nhà khoa học nhìn nhận lợi ích của GMOs nhưng xét về mặt an toàn sinh học thì vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau về các sản phẩm biến đổi gen. Người ta thấy rằng cây trồng chuyển gen có thể có những nguy cơ tiềm ẩn sau:

- Mối nguy hiểm do vô tình đưa những chất gây dị ứng hoặc những chất làm giảm dinh dưỡng vào thực phẩm;
- Khả năng phát tán những gen biến nạp trong cây trồng sang cây trồng hoang dại;
- Sâu bệnh có nguy cơ tăng cường tính kháng với các chất độc tiết ra từ cây chuyển gen;
- Nguy cơ những chất độc này tác động tới sinh vật không phải sinh vật cần diệt.

Để giảm thiểu tới mức thấp nhất những nguy cơ tiềm ẩn của sinh vật biến đổi gen tại Việt Nam, chúng tôi đưa ra hai giải pháp sau:

3.8.1. Đánh giá nguy cơ tiềm ẩn của cây chuyển gen dựa vào cấu trúc phân tử

*** Đánh giá khả năng gây dị ứng của protein Bt**

Việc đánh giá an toàn thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng, động vật chuyển gen và động vật nhân dòng đều được quản lý như nhau và đánh giá dựa vào phương pháp so sánh. Phương pháp so sánh đã được phát triển như là một công cụ để nhận biết rõ ràng những điểm giống nhau và khác nhau giữa thực phẩm mới (thực phẩm có nguồn gốc từ GMOs) và thực phẩm truyền thống (là thực phẩm có nguồn gốc an toàn). Vấn đề an toàn thực phẩm được quan tâm nhất chính là liệu các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ GMOs có đặc tính gây dị ứng hay không? Vì vậy trước khi các sản phẩm GMOs trở thành sản phẩm thực phẩm thì chúng cần được đánh giá về khả năng gây dị ứng.

→ Giải pháp đánh giá khả năng gây dị ứng của sản phẩm chuyển gen có chứa protein Bt:

- Thử nghiệm liên kết huyết thanh
- Thử nghiệm lâm sàng
- Thử nghiệm trên động vật
- So sánh trình tự protein giữa các protein lạ và các protein gây dị ứng đã biết

Ví dụ trường hợp protein *Cry9C*:

Gen *Cry9C* đã được chuyển vào plasmid pGI9CK, pRVA9909 và sau đó được biến nạp vào trong ngô StarLink (dòng ngô CBH-351). Protein này được tạo ra 1 cách tự nhiên từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis sp. tolworthi*, là biến thể của nhóm độc tố *Bt*, kể cả *CryIA* đã được sử dụng để thương mại. Các độc tố *Bt* hoạt động nhờ liên kết với các thụ quan đặc hiệu trên các tế bào ruột giữa của côn trùng, gây ra sự tiêu huỷ và cuối cùng làm thối rữa bộ máy tiêu hoá của côn trùng. Protein *Bt* là vật chủ đặc hiệu và không liên kết với các tế bào của động vật có xương sống.

Theo Trung tâm kiểm soát bệnh (CDC), protein *Cry9C* có chung 1 vài đặc tính phân tử với các protein mà đã được biết là các chất gây dị ứng ở thực phẩm, vì thế cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (EPA) không cấp giấy phép cho ngô StarLink dùng làm sản phẩm thực phẩm của con người.

- Phân tích cấu trúc phân tử của protein *Cry9C*: bằng các phương pháp như SDS-PAGE, Western blots, giải trình tự N-terminal amino acid, các thử nghiệm glycosyl hoá (glycosylation tests),... đã xác định được rằng: *Cry9C* có 625 amino acid và có kích thước 1878 bp.

Qua đánh giá cho thấy: phạm vi ảnh hưởng tác động đến khả năng gây dị ứng của các sản phẩm có chứa protein *Cry9C* đối với con người là thấp, xấp xỉ 1% đối với người trưởng thành và 5% đối với trẻ em dưới 7 tuổi. Người ta ước tính rằng khoảng 7,5% dân số có biểu hiện dị ứng hoặc mẫn cảm với một số thực phẩm.

- Thử nghiệm liên kết huyết thanh: Các mẫu huyết thanh đã mã hoá được phân tích từ 28 người có phản ứng dị ứng với ngô StarLink thì cũng nhạy cảm cao đối với các chất dị ứng khác nhau. Các nghiên cứu của họ có thể không xác định được mối liên hệ giữa *Cry9C* và việc sản xuất lượng IgE đặc hiệu với *Cry9C* có thể xác định.

* Đánh giá rủi ro đến môi trường và hiện tượng trôi gen sang các loài khác

Những cuộc tranh luận xung quanh ảnh hưởng của cây chuyển gen đối với môi trường ngày càng phức tạp, căng thẳng và rất nhạy cảm. Vấn đề này ngày càng phức tạp hơn khi có các nghiên cứu mới được công bố. 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.

Những hậu quả gì có thể xảy ra khi đưa các gen mới vào trong môi trường là một câu hỏi đầu tiên và quan trọng nhất khi nghiên cứu ứng dụng các vi sinh vật biến

đổi gen (GMMs). Cần phải xem xét để trả lời câu hỏi rằng: liệu các gen đã được chuyển vào GMMs có gây hại gì cho con người, cây trồng, vật nuôi hay động thực vật hoang dã hay không? Trước tiên, đáng lo ngại là bất kỳ GMMs nào đưa vào môi trường đều có thể đột biến thành mầm bệnh cho động vật hay thực vật. Tuy nhiên, rủi ro này đã được chứng minh là khó có thể xảy ra trong thực tế vì khả năng gây bệnh phụ thuộc vào loại gen, thể nhận và pháp luật tại những nơi đang xem xét ứng dụng GMMs. Trong số tất cả các loại gen sử dụng trong công nghệ GMMs, lo ngại lớn nhất là gen kháng kháng sinh. Lý do của sự lo ngại này là sự xuất hiện tính kháng kháng sinh ở các chủng phân lập từ các bệnh phẩm.

Đối với cây trồng biến đổi gen thì 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 này có thể xảy ra, được đánh giá trước quá trình chuyển gen và được kiểm soát sau khi cây được đưa ra trồng. Khả năng xảy ra lai chéo xa giữa gen được chuyển vào với các cây cỏ họ hàng, cũng như khả năng tạo ra những loại cỏ mới.

Sự trôi gen trong thực vật xảy ra khi có hiện tượng thụ phấn từ cây này sang cây khác, nếu phấn từ cây chuyển gen được di chuyển bởi gió hoặc côn trùng thì đều liên quan đến các cây không chuyển gen, các gen chuyển có thể bị tích hợp vào genome của thế hệ con cháu, do đó làm thay đổi tính trạng của thế hệ con cháu. Trước đây vấn đề trôi gen từ cây chuyển gen đã nhấn mạnh về sự di chuyển của gen chuyển tới các mối quan hệ với cây trồng hoang dại, trong khi đó ảnh hưởng của tính kháng côn trùng lại bị bỏ qua.

* Giải pháp về hiện tượng trôi gen ở một số cây trồng:

Hiện tượng trôi gen ở ngô

Ngô là loài cây thụ phấn chủ yếu nhờ gió, khoảng 97% giao phối cùng giống giữa các cây với nhau và sự thụ phấn xảy ra trong khoảng 200m. Để kiểm tra giả thuyết về sự trôi gen từ ngô Bt sang các giống ngô bình thường để tạo ra độc tính Bt trong ngô không chuyển gen, người ta đã kiểm tra các mẫu hạt của ngô không chuyển gen mà được trồng gần với ngô chuyển gen. Kết quả kiểm tra cho thấy rằng nồng độ độc tính Bt-CryIA(b) trong các hạt và tỷ lệ % của hạt có độc tố CryIA(b) giảm so với ngô chuyển gen. Những kết quả này cho thấy hiện tượng trôi gen gián tiếp thông qua thụ phấn từ ngô chuyển gen là nguyên nhân gây ra sự tạo thành độc tính Bt trong hạt của những cây không chuyển gen.

→ Kết quả kiểm tra cho thấy:

+ Hiện tượng trôi gen từ ngô Bt chuyển gen tới ngô Bt không chuyển gen xảy ra ở khoảng cách 31m

+ Các thử nghiệm ELISA về ngô không chuyển gen cho thấy rằng nồng độ độc tính Bt *CryIA(b)* và tỷ lệ % *CryIA(b)* trong các hạt giảm theo khoảng cách trồng so với ngô Bt chuyển gen. Có nghĩa là nồng độ *CryIA(b)* trong các hạt lai Bt là $260 \pm 19\text{ng/g}$. Nồng độ độc tính Bt trong ngô không chuyển gen cao nhất trong khoảng cách 2m so với ngô chuyển gen và giảm nhanh theo khoảng cách. Ở khoảng cách 31m thì nồng độ *CryIA(b)* trong các hạt của ngô không chuyển gen là $4,4 \pm 1,2\text{ ng/g}$ tương đương với 1,7% so với nồng độ trong hạt của những cây trồng sát với cây chuyển gen [41].

Như vậy giải pháp để quản lý hiện tượng trôi gen ở ngô chuyển gen là trồng ở khoảng cách 31m .

Hiện tượng trôi gen ở lúa

Lúa là loài cây có tỷ lệ tự thụ phấn cao và rất ít khi thụ phấn chéo giữa cây bên cạnh hoặc trong cả cánh đồng (ít hơn 1%).

Hạt phấn lúa mất tác dụng sau 5 phút sau khi rơi ra nếu nó không được thụ phấn. Trong một vài trường hợp đặc biệt thì hạt phấn có thể tồn tại độc lập được 15 phút ngoài môi trường. Sự di chuyển theo phương ngang của hạt phấn rất hạn chế. 10m là khoảng cách cần thiết để tạo ra cây lai và có thể tránh được sự nhiễm bệnh với những hạt phấn từ các cánh đồng gần kề [80].

Tuy nhiên, sự thụ phấn chéo cũng chỉ xảy ra ở một vài phạm vi, tỷ lệ thụ phấn chéo phụ thuộc vào yếu tố khí hậu và những yếu tố về sự đa dạng khác. Tỷ lệ giao phối cùng giống thường xảy ra nhiều hơn ở các giống lúa Indica và một số loài lúa đại hơn là ở giống lúa Japonica [104]. Lord (1935) đã tìm ra rằng với điều kiện khí hậu khác nhau ở hai quận của Sri Lanka thì tỷ lệ giao phối tự nhiên thường là từ 0.34% - 0.67%, trong khi đó theo Brown (1957) thì tỷ lệ thụ phấn chéo tự nhiên ở Malaysia là 0.41%. Còn theo Srinivasan và Subramanian(1961) thì tỷ lệ thụ phấn chéo tự nhiên ở Ấn Độ chỉ là từ 0.04% - 0.03% và khoảng cách tối thiểu để tránh hiện tượng thụ phấn chéo là từ 1.8 - 2.1m từ các tác nhân thụ phấn.

Các thí nghiệm cho thấy rằng trôi gen gián tiếp thông qua thụ phấn từ lúa chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ tới cây lúa bên cạnh không chuyển gen là 0,01 - 0,53% ở khoảng cách từ 1 – 5m [94].

Trôi gen từ cây trồng tới cây hoang dại: gen chuyển được đưa vào lúa thì cũng sẽ vào quần thể lúa hoang dại, mặc dù tỷ lệ thụ phấn chéo là rất thấp [53]. Ví dụ trôi

gen từ khoảng đất thí nghiệm nhỏ của lúa chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ tới lúa hoang dại là từ 0-0,06% ở Trung Quốc và Châu Âu [43, 95]. Tương tự như vậy, Gealy và Cs (2003) trước đó cũng có những thí nghiệm về trôi gen từ lúa được gieo trồng tới lúa hoang dại và chú ý rằng tỷ lệ lai giữa cây trồng và loài hoang dại của chúng xấp xỉ 0,01-1%. Họ cũng chú ý rằng trôi gen có thể xảy ra theo định hướng từ cây trồng tới loài hoang dại hoặc từ loài hoang dại tới cây trồng.

Tuy vậy, tỷ lệ tự thụ phấn của lúa và hầu hết các loài hoang dại của chúng là cao, nên cây trồng này được đánh giá là loài rủi ro thấp trong mối liên quan đến các cây trồng chuyển gen khác nhau [123]. Tuy nhiên, nếu gen chuyển đủ mạnh trong điều kiện thuận lợi thì nó có thể nhanh chóng được chuyển vào các quần thể hoang dại của chúng, mặc dù tỷ lệ thụ phấn chéo là rất thấp [49]. Bên cạnh đó sự trôi gen trong các loài tự thụ phấn như lúa mì, đậu tương cũng rất ít khi xảy ra và hiện tượng trôi gen giữa các loài này với quần thể hoang dại là bằng không [114].

Như vậy, khoảng cách an toàn để quản lý sự trôi gen của lúa là 5m .

Giải pháp để quản lý sự trôi gen từ cây trồng chuyển gen (GMCs) là trồng chúng ở khoảng cách an toàn và sau khi trồng ta sẽ đánh giá khả năng trôi gen của GMCs bằng các phương pháp như ELISA, PCR, lai ADN,...

* Đánh giá an toàn hệ nước ngầm và hệ sinh thái đất

Protein tồn tại tương đối bền trong đất và được phân loại như là dạng bất động vì chúng không có khả năng di chuyển hoặc thấm qua nước ngầm. Các protein không bền vững trong điều kiện đất axit. Khi phơi dưới ánh nắng mặt trời chúng bị phân huỷ nhanh chóng dưới tác động của tia cực tím.

Các chuyên gia đã tiến hành những nghiên cứu độc lập nhằm điều tra các ảnh hưởng của cây trồng Bt đối với sinh vật đất và các loài côn trùng khác được xem là có ích trong nông nghiệp. Kết quả cho thấy, chúng không gây ra ảnh hưởng bất lợi đối với các sinh vật đất không phải là đích tấn công của chúng, thậm chí ngay cả khi các sinh vật này được xử lý Bt với liều lượng cao hơn nhiều so với thực tế có thể xảy ra trong điều kiện trồng trọt. Nghiên cứu của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Mỹ (EPA) cũng cho thấy không có sự thay đổi nào trong quần thể vi sinh vật đất giữa các cánh đồng trồng cây chuyển gen Bt và cánh đồng trồng các giống cây truyền thống [47], cũng như không quan sát thấy sự khác biệt giữa các cánh đồng trồng cây chuyển gen Bt và cây không chuyển gen Bt [48].

Một vấn đề nảy sinh trong nghiên cứu liên quan đến an toàn của vi sinh vật chuyển gen (GMM) trong môi trường là số phận của các ADN ngoại bào trong môi trường bị ảnh hưởng bởi các điều kiện sinh học và phi sinh học của môi trường. Nhiều vi khuẩn sản sinh các chất để phân huỷ các ADN ngoại lai. Tuy nhiên, người ta vẫn phát hiện được sự tồn tại của các ADN có trọng lượng phân tử cao trong đất và nước không bị phân huỷ.

Ngoài những mối lo ngại về cây trồng chuyển gen, người ta cũng có mối quan tâm đến vi sinh vật chuyển gen (GMMs). Rằng liệu việc đưa GMMs vào môi trường tự nhiên có gây ra sự mất cân bằng sinh thái do sự tương tác lẫn nhau giữa các loài trong hệ sinh thái hay không? Rõ ràng là việc giải phóng không mong muốn các GMMs gây bệnh có thể gây ra các tác động có hại không chỉ với ký chủ mà còn gián tiếp với cấu trúc hệ sinh thái.

Hai ví dụ điển hình không liên quan đến vi khuẩn là virus myxoma của thỏ và bệnh nấm của cây đu đủ Hà Lan. Không chỉ mầm bệnh này giết ký chủ mà còn dẫn đến thay đổi cấu trúc quần xã sau khi tiêu diệt động vật ăn cỏ hay một cấu phần quan trọng của vùng rừng rụng lá sớm ở Châu Âu. Nếu lo ngại liên quan đến việc đưa các GMMs gây bệnh vào môi trường thì rõ ràng là cần phải xem xét đến cả vai trò quan trọng của ký chủ trong hệ sinh thái.

Một vấn đề liên quan nữa là việc đưa một vi khuẩn gây bệnh vào môi trường có thể gây ra tác động thứ cấp trong quần xã vi sinh vật hay không? Mặc dù giải phóng GMMs trong phạm vi hẹp không gây ra tác động có hại. Nghiên cứu chủ yếu hướng vào giải quyết các vấn đề liệu có tác động nào do cạnh tranh khốc liệt giữa GMMs và vi sinh vật bản địa hay tương tác giữa vi khuẩn và thực khuẩn thể? Đó chính là những vấn đề có thể nảy sinh khi đưa GMMs vào môi trường.

Từ đó ta có thể đưa ra giải pháp để quản lý GMOs khi đánh giá an toàn đối với hệ nước ngầm và hệ sinh thái đất:

- Cần phải sử dụng công nghệ hiện đại để hiểu sâu hơn biến động quần thể vi sinh vật trong môi trường tự nhiên. Chẳng hạn như, một câu hỏi được đặt ra với các sinh vật bậc cao là liệu chức năng hệ sinh thái bị phá huỷ khi đa dạng sinh học quần xã giảm hay không? liệu mất đi một phần nhỏ quần xã có gây phá huỷ chức năng của nó hay không... Nghiên cứu thực nghiệm với các vi sinh vật sẽ giúp chúng ta đánh giá được rủi ro mất cân bằng sinh thái.
- Rủi ro khi sử dụng GMMs phụ thuộc vào đặc điểm của vi sinh vật và vị trí ứng dụng. Rủi ro quan trọng nhất với GMMs là chuyển các gen tái tổ hợp sang các sinh

vật khác và phá huỷ cân bằng sinh thái. Trong cả hai trường hợp này rủi ro có thể xảy ra ở mức thấp nhất nếu sử dụng các GMMs mang các đoạn gen chuyển bền vững và không có các vật liệu tái tổ hợp không cần thiết có thể mang ưu thế chọn lọc hơn các sinh vật khác đã có mặt trong môi trường.

- Hiểu về hậu quả của việc đưa các gen mới vào vi khuẩn cần xem xét đến di truyền quần thể vi khuẩn và sinh thái học quần thể cũng như các cơ chế điều hoà biểu hiện gen và hoạt động chức năng của các protein mà gen đó mã hoá cho. Rõ ràng nhân tố quan trọng là bản chất và sự bền vững của cấu trúc gen cần được đánh giá bằng các kỹ thuật phân tử và tế bào trong phòng thí nghiệm. Ngoài ra một vấn đề quan trọng cần xem xét đến đó là xác suất các gen chuyển có thể lan truyền trong môi trường thông qua các cơ chế trao đổi tự nhiên với các vi sinh vật khác. Quan trọng nhất là cần phát triển công nghệ cho phép tiên đoán biến động sinh thái quần xã vi sinh vật khi có mặt các GMMs.

* *Đánh giá an toàn đối với động vật và côn trùng*

Các thử nghiệm tiến hành trên chó, chuột lang, thỏ, cá, ếch và chim cho thấy protein Bt không gây ra những ảnh hưởng có hại. Cũng cần nhấn mạnh rằng, độc tố hoàn toàn không gây ảnh hưởng đến các loài côn trùng có ích hoặc động vật ăn thịt như ong mật và bọ cánh cứng. Năm 1996, một báo cáo về ảnh hưởng có hại của hạt phấn từ cây ngô Bt đến ấu trùng của loài bướm Monarch. Báo cáo này đã gây ra mối quan tâm và lo ngại về những rủi ro mà thực vật Bt có thể gây ra đối với sinh vật không cần diệt. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy ngô Bt gây ra ảnh hưởng không đáng kể đối với quần thể bướm Monarch trên cánh đồng. Các nghiên cứu đi đến kết luận rằng, hầu hết các giống lai thương mại, protein Bt được biểu hiện với nồng độ rất thấp trong hạt phấn và nghiên cứu trong phòng thí nghiệm cũng như trên cánh đồng cho thấy mọi mật độ hạt phấn đều không gây ảnh hưởng có hại trên đồng ruộng.

* *Đánh giá những rủi ro của gen kháng kháng sinh trong các cây trồng chuyển gen*

Gen kháng kháng sinh là một công cụ quan trọng trong kỹ thuật di truyền nói chung và trong công nghệ sinh học thực vật nói riêng. Nó là chìa khoá trong kỹ thuật di truyền để nhận biết và chọn lọc các tế bào chứa gen mới. Gen kháng kháng sinh có thể được sử dụng như một gen đích mang tính trạng hoặc đặc điểm quan tâm. Việc xác định các tế bào chuyển gen sẽ rất khó và thậm chí không thể, vì chỉ có một phần nhỏ tế bào chứa gen được chuyển (một trong hàng ngàn tế bào). Quá trình chọn lọc là rất cần thiết trong kỹ thuật di truyền và đây là lý do tại sao các gen kháng kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghệ sinh học khác nhau.

Việc đánh giá an toàn cây trồng chuyển gen chứa các marker kháng kháng sinh đã được các chuyên gia xem xét cẩn thận, các chuyên gia đã đánh giá tính an toàn của cây trồng chuyển gen chứa gen *nptII* kháng kanamycin và neomycin, gen *aad* kháng streptomycin và spectinomycin và gen *bla* kháng ampicilin. Các chuyên gia đã kết luận rằng mức độ rủi ro của cây trồng chứa những gen này đối với quần thể vi sinh vật là không đáng kể.

Các gen kháng kháng sinh sử dụng trong công nghệ sinh học thực vật được thu nhận từ vi khuẩn tự nhiên. Gen *nptII* được phân lập từ vi khuẩn *E. coli transposon* Tn5, có 264 aa và kích thước 2010 bp. Các sản phẩm của marker này đã được phê chuẩn và được sử dụng rộng rãi. Cơ chế chuyển các gen từ các tế bào thực vật tới vi khuẩn chưa được biết rõ. Việc chuyển gen tới các vi khuẩn đất có thể xảy ra trong lý thuyết, trên đồng ruộng nơi cây trồng chuyển gen đã được trồng. Tuy nhiên, điều này vẫn chưa được xác định. Các gen kháng kháng sinh chỉ kháng lại các chất kháng sinh đặc hiệu. Các marker kháng kháng sinh không có trong quá trình sản xuất các chất kháng sinh. Vì vậy chúng không có mặt trong thực phẩm tạo ra từ các cây chuyển gen.

Các nhà khoa học đồng ý rằng nguyên nhân chính của việc kháng kháng sinh là do lạm dụng các chất kháng sinh ở người và thuốc thú y. Công chúng lo lắng về việc sử dụng cây trồng mang gen kháng kháng sinh, tuy nhiên rủi ro của các chất kháng sinh được xem như là không có, thậm chí không có đủ chứng cứ để nói rằng các gen kháng kháng sinh hoặc những marker khác là có những ảnh hưởng có hại.

Hơn nữa, cho đến nay không có bằng chứng thí nghiệm nào cho thấy sự chuyển gen ngang (HGT) các vật liệu di truyền từ thực vật sang vi khuẩn có thể xảy ra [101]. Trong vài năm gần đây khủng hoảng kháng sinh ngày càng nhiều, liên quan đến vấn đề vi khuẩn kháng kháng sinh, thậm chí đôi khi kháng với mọi kháng sinh. Liệu nhận thức y tế cộng đồng thay đổi hay có dữ liệu mới về sự chuyển gen ngang từ thực vật sang vi khuẩn đã làm bùng nổ sự tranh cãi giữa các nhà khoa học và trong cộng đồng?

Thực tế cho rằng các gen kháng kháng sinh thường được định vị trên các yếu tố di truyền động, được phát triển rộng ở các quần thể vi khuẩn và việc chuyển gen ngang từ cây chuyển gen sang vi khuẩn xuất hiện với tần suất cực thấp và vẫn chưa phát hiện được dưới điều kiện thực tế, dường như không phải là các gen kháng kháng sinh đóng vai trò như là các gen chỉ thị trong cây trồng chuyển gen sẽ đóng góp một cách đáng kể vào việc lan toả tính kháng kháng sinh trong các quần thể vi khuẩn.

Giải pháp để hạn chế vấn đề này là sử dụng ít hoặc không dùng gen kháng kháng sinh làm gen chỉ thị trong kỹ thuật di truyền.

3.8.2. Đánh giá nguy cơ tiềm ẩn của cây chuyển gen dựa vào đặc điểm hình thái

Đặc điểm kiểu hình cho phép xác định sự có mặt hoặc không có mặt của một tính trạng đặc biệt, như thử nghiệm tính kháng thuốc trừ cỏ. Như vậy những thử nghiệm có thể được sử dụng để kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của các dòng GMO kháng thuốc trừ cỏ được gọi là các phân tích sinh học về tính kháng thuốc trừ cỏ. Chúng bao gồm các thử nghiệm về khả năng nảy mầm trên môi trường có bổ sung thuốc trừ cỏ đặc biệt, qua đó thấy được sự khác biệt giữa hạt chuyển gen và hạt không chuyển gen. Mức độ phát hiện dựa vào khả năng nảy mầm của hạt và các phương pháp làm cho hạt nảy mầm để chắc chắn rằng tất cả các hạt nảy mầm có thể sống được. Những hạt đã được khẳng định trong quá trình kiểm tra phải được sử dụng để giúp cho các thử nghiệm tiếp theo được xác thực hơn.

Các thử nghiệm sinh học về thuốc trừ cỏ phải chính xác, không đắt và có thể được dùng cho mục đích thử nghiệm ban đầu về phòng bệnh của các công ty hạt giống. Các công ty đang sử dụng các phân tích sinh học về thuốc trừ cỏ để kiểm tra các mặt hàng đặc biệt. Hiện nay, các phân tích sinh học về thuốc trừ cỏ có thể được áp dụng đối với đậu tương Roundup Ready, ngô Liberty Link, bông và cải dầu. Trong tương lai, các phân tích sinh học được dùng để kiểm tra khả năng kháng sâu và nhiều giống GMO khác nữa.

3.8.3. Ví dụ về việc đánh giá mối nguy cơ tiềm ẩn khi ứng dụng chủng *E. coli* chuyển gen

Đa số sinh vật chuyển gen (GMMs) được tạo ra là do kết quả của các nghiên cứu nhân dòng phân tử. Điều này có thể được định nghĩa giống như là quá trình biến nạp của các vi sinh vật nhận (thường sử dụng chủng *E. coli*) với các cấu trúc episom (chẳng hạn như plasmid) mang các trình tự mong muốn. Các sinh vật biến đổi gen này sau đó được nuôi cấy để tách chiết và tinh sạch các cấu trúc plasmid để sử dụng trong chuyển gen thực vật hoặc các ứng dụng khác.

Các thủ tục đánh giá rủi ro đối với *E. coli* biến đổi gen cũng giống như các bước đánh giá của GMMs khác. Các nguyên lý cơ bản trong việc xác định mối đe dọa và những tác động có hại đến sức khỏe con người và môi trường là những yêu cầu bắt buộc phải có trong đánh giá GMMs. Tuy nhiên kể từ khi các nghiên cứu cloning sử dụng các chủng *E. coli* làm thể cho thì đa số các GMMs này có rủi ro thấp hơn. Vì vậy, các vi sinh vật biến đổi gen này sẽ được yêu cầu đánh giá ở mức thấp nhất và các vi

sinh vật này nên được đánh giá theo cách tương xứng với những mối nguy hiểm trên thực tế mà nó gây hại. Người sử dụng nên thông qua các cách tiếp cận thực tế và tránh những đánh giá quá phức tạp và những tiêu chí đánh giá không có cơ sở.

♦ Đánh giá rủi ro của chủng *E. coli* đối với sức khỏe con người:

- *Những mối đe dọa liên quan đến chủng vi khuẩn nhận:*

Nhiều vi sinh vật có nguồn gốc từ chủng *E. coli* K-12 và *E. coli* B đã được chứng minh là không mang mầm bệnh và có những thương tổn di truyền ổn định trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Những thương tổn này thường có trong vi sinh vật dị dưỡng và phụ thuộc thành phần dinh dưỡng mà được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, các chủng này không thể tồn tại trong động vật có vú, do những động vật này có những giới hạn sinh học hoặc có tính nhạy với các yếu tố phổ biến.

Chủng *E. coli* đã được phân loại vào nhóm rủi ro 2 và 3 nên chúng được quản lý theo mức độ 2 và 3. Chủng *E. coli* K-12 và B có lịch sử an toàn từ lâu và có thể được quản lý an toàn theo chính sách ở mức độ 1. Chủng *E. coli* K-12 có thể sống sót được vài ngày trong ruột người và tồn tại lâu trong môi trường.

- *Những mối nguy hiểm liên quan đến gen chuyển:*

Chủng vi khuẩn nhận thường được làm yếu đi và không mang mầm bệnh đối với con người, đa số các mối đe dọa đối với sức khỏe con người sẽ phát sinh do tự nhiên của vật liệu di truyền đã chuyển vào. Vì vậy, việc đánh giá rủi ro nên được cân nhắc đến những ảnh hưởng tiềm tàng của các sản phẩm đã biểu hiện. Theo luật GMOs quy định đối với các đánh giá rủi ro và bất kỳ tác động có hại nào liên quan đến vật liệu di truyền ngoại sinh đã chuyển vào vi sinh vật hoặc hệ thống vector GM thì nên được đưa vào bản báo cáo. Phải xem xét cân nhắc xem các trình tự đã chèn có mang hoạt tính sinh học có hại như độc tố, các yếu tố kích thích sinh trưởng hay không, xem xét các trình tự liên quan đến sự biểu hiện của gen chèn (chẳng hạn như promoter và các vùng kiểm soát) và các sản phẩm khác phải không có các hoạt tính có hại sẵn có nhưng lại có các tác động bất lợi khác (như các chất gây dị ứng và các protein sinh kháng thể).

Điều quan trọng nữa là phải xem xét đến các hoạt tính sinh học tiềm ẩn của sản phẩm đã mã hoá bởi gen chèn và bất kỳ ảnh hưởng bất lợi nào gây ra bởi việc giải phóng hoặc biểu hiện của sản phẩm đó, ví dụ như các gen có thể biến đổi tình trạng bất thường của tế bào (như các gen đột biến gây ung thư, các yếu tố kích thích sinh trưởng). Các thành tố kiểm soát sự biểu hiện của gen trong GMMs nên được hiểu một cách rõ nét trước khi GMMs được phóng thích.

Đối với các nghiên cứu cloning, hầu hết các trình tự sẽ được thực hiện trên các cấu trúc episom, chẳng hạn như plasmid. Trạng thái đưa plasmid vào nên được cân nhắc, và giống như quy định chung, các plasmid không linh động nên được sử dụng bất cứ đâu có thể. Nên chú ý quan tâm đến các gen chèn mà mã hoá các sản phẩm tiềm ẩn hoạt tính sinh học có hại, ví dụ như độc tố, cytokinin, các yếu tố sinh trưởng, các chất gây dị ứng, các hoócmon hoặc các chất gây ung thư. Trong nhiều trường hợp, sản phẩm sẽ không được biểu hiện, giống như không có các trình tự promoter xuất hiện trong quá trình sao chép trực tiếp. Vì vậy, sự biểu hiện các gen có hại tiềm ẩn sẽ không có trong *E. coli* nếu chúng chịu sự điều khiển của các promoter của sinh vật nhân chuẩn. Trường hợp sản phẩm gen có khả năng tăng tính độc hại ở nơi mà không có sự biểu hiện nào được đoán trước, hoặc nơi mà sản phẩm đã biểu hiện được sinh ra ở dạng không hoạt tính thì đó là điều không may mắn. Các sản phẩm gen của sinh vật nhân chuẩn thường không hoạt động bởi hệ thống thể nhận thuộc sinh vật nhân chuẩn thiếu các con đường thường biến sau chuyển dịch. Hơn nữa các protein đã biểu hiện thường tích tụ trong tế bào giống như các thể hình tròn không hoà tan, hoặc không thể tiết ra được, và sẽ không đưa ra mức độ rủi ro tương tự nếu đã biểu hiện trong hệ thống sinh vật nhân chuẩn. Ví dụ trường hợp nhiều cytokinin không glycozyl hoá có cả hoạt tính sinh học và hoà tan được khi biểu hiện trong *E. coli*. Trình tự nên được nghiên cứu một cách cẩn thận để đảm bảo rằng các promoter của sinh vật nhân chuẩn đã được sinh ra trong suốt các bước thực hiện cloning hoặc do sự thích hợp trình tự của các vùng điều khiển. Nếu sự biểu hiện xảy ra, sau đó hoạt tính sinh học và khả năng sinh miễn dịch/khả năng gây dị ứng của sản phẩm phải được xem xét và cân nhắc.

- *Mối nguy hiểm xuất hiện từ những biến đổi của các tính trạng vốn có:*

Phương pháp tiếp cận được đưa ra khi các gen của sinh vật nhân chuẩn có hại được nhân dòng và có thể được biểu hiện trong *E. coli*, đặc biệt nếu nó mã hoá yếu tố di truyền có khả năng gây bệnh. Ví dụ như gen độc tố của vi khuẩn mà vẫn có các trình tự điều khiển tự nhiên của nó có thể được biểu hiện, xử lý và tiết ra trong *E. coli* và điều này có thể làm xuất hiện các chất gây độc. Các chất này có thể tạo ra rủi ro nhiều hơn đối với sức khỏe con người hơn là chủng nhận. Tương tự, sự biểu hiện trong *E. coli* của các yếu tố di truyền xâm nhập của vi khuẩn (ví dụ như các gen *Yersinia inv*) có thể là kết quả của sự xâm nhập và liên quan đến sự gia tăng khả năng sinh bệnh so với chủng nhận.

♦ Đánh giá rủi ro của chủng *E. coli* đối với môi trường:

- *Khả năng sống sót và tính ổn định:*

Dù chủng *E. coli* đã biến nạp có khả năng sống sót trong môi trường hay không thì đây là một mối quan tâm lớn. Hầu hết các chủng đã được làm yếu đi đều sống dị dưỡng và sẽ hiếm thấy ngoại trừ trong môi trường đặc hiệu. Tuy nhiên, các chủng *E. coli* đã bị thương tổn thường tồn tại trong môi trường được vài ngày.

- *Mối nguy hiểm của các gen chuyển:*

Tần số gen ngang chuyển thành công vào trong môi trường thường rất thấp, đặc biệt là nơi mà các cấu trúc không linh động được sử dụng. Tuy nhiên, các gen điều khiển plasmid đòi hỏi phải xem xét chi tiết, việc biến nạp thụ động nên được cân nhắc về những rủi ro có khả năng xảy ra. Hạn chế khả năng mà bất kỳ gen nào có thể được chuyển cần phải có điểm cư trú trong tự nhiên của chính gen đó. Người ta có thể thấy rằng trình tự “có hại đối với môi trường” (ví dụ như marker kháng thuốc) có thể xuất hiện trong tự nhiên và vì vậy sự tác động của hiệu ứng chuyển sẽ được làm giảm bớt. Tuy nhiên, hậu quả của việc chuyển các gen đã chèn nên được đánh giá, đặc biệt nếu gen chèn có lợi đối với các mầm bệnh xảy ra trong tự nhiên hoặc có lợi đối với các sinh vật khác.

Trong một vài trường hợp các GMMs có thể ít gây ra rủi ro đối với sức khỏe con người nhưng có khả năng gây ra mối nguy hiểm đối với các loài khác. Vì vậy cần xem xét các ảnh hưởng bất lợi tiềm ẩn của các sản phẩm đã mã hoá đối với các sinh vật này.

- *Mối nguy hiểm xuất hiện từ sự biến đổi các tính trạng vốn có:*

Phải có mối cân nhắc cẩn thận khi nhân dòng bất kỳ gen nào mà có thể làm cho *E. coli* biến đổi di truyền để định cư hoặc có ảnh hưởng bất lợi đến các loài động vật. Phương pháp tiếp cận nên cẩn thận khi các gen đã nhân dòng mà mã hoá các sản phẩm có thể có hại đối với động vật có thể được biểu hiện trong *E. coli*. Trong trường hợp này ngoài việc đưa ra các tiêu chuẩn đánh giá còn phải ngăn chặn sự phóng thích ra ngoài môi trường.

- *Các thủ tục pháp lý và các tiêu chuẩn đánh giá, quản lý:*

Hầu hết các GMMs này rơi vào loại hoạt tính thấp nhất, chính sách ngăn chặn ở mức độ 1, bổ sung các nguyên lý hoạt động của vi sinh vật có giá trị thì sẽ bảo vệ được đối với cả sức khỏe con người và môi trường.

3.9. Kết quả ứng dụng tin sinh học để lập bản đồ chỉ thị phân tử của gen liên quan đến bệnh đạo ôn và gen chịu hạn ở lúa

3.9.1. Kết quả nghiên cứu lập bản đồ gen kháng đạo ôn ở Lúa Dự chiêm

Đạo ôn là một loại bệnh hại nghiêm trọng và thường xuyên xảy ra ở lúa làm ảnh hưởng lớn đến nghề trồng lúa trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Trong công tác phòng trừ bệnh, biện pháp sử dụng nguồn gen để tạo ra giống mới kháng bệnh được xem là có hiệu quả nhất, tuy nhiên muốn phát huy cao hiệu quả biện pháp này thì các gen kháng bệnh cần phải được phân tích và xác lập bản đồ của chúng.

Việt Nam được coi là trung tâm của sự đa dạng thực vật trong đó có cây lúa, sự đa dạng này cũng đồng nghĩa với sự đa dạng về nguồn gen quý. Trong số các giống lúa được thu thập và kiểm định ở Việt Nam, rất nhiều giống có khả năng kháng bệnh đạo ôn cao và chúng thực sự là nguồn gen quý trong tạo giống lúa kháng bệnh nếu như các gen kháng được phân tích và lập bản đồ phân tử. Lập bản đồ gen kháng bệnh đạo ôn ở các giống lúa địa phương Việt Nam chỉ mới ở giai đoạn bắt đầu và mới chỉ dừng lại ở một vài nghiên cứu có tính chất thăm dò, trong khi đó thực tế của công tác chọn tạo giống kháng bằng chỉ thị phân tử lại đang đòi hỏi có bản đồ phân tử của các gen kháng bệnh; đặc biệt là các chỉ thị phân tử liên kết với gen. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này đã tiến hành phân tích xác lập bản đồ gen kháng đạo ôn qua phân tích quần thể F₂ giữa tổ hợp lai gồm: giống lúa Dực chiêm và giống lúa CR203 phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn.

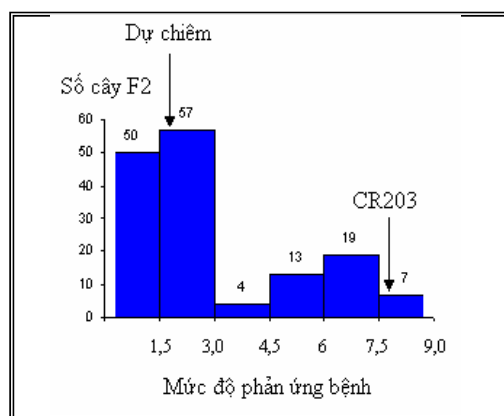
Để tiến hành lập bản đồ gen qui định một đặc tính nào đó trong cây trồng, chúng ta phải tạo quần thể lập bản đồ. Quần thể lập bản đồ có thể là: F₂, RIL (F₆), BC (backcross).v.v. Mỗi loại quần thể có những ưu điểm riêng của nó như quần thể F₂ dễ tạo lập, quần thể F₆ là nguồn cung cấp giàu vật liệu cho nhận dạng ADN. v.v. Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn quần thể F₂ nhằm nhanh chóng xác định các gen kháng trên nhiễm sắc thể trong hệ gen của lúa.

Lựa chọn chỉ thị phân tử trong lập bản đồ gen là việc làm rất quan trọng, bởi mỗi loại chỉ có những thuận lợi và hạn chế của nó. Chỉ thị RFLP (Restriction Length Polymorphism) là chỉ thị đồng trội, có tính ổn định và chính xác cao tuy nhiên lại rất tốn kém và khó thực hiện; sử dụng chỉ thị RADP (Random Amplified Polymorphic DNA) đơn giản, dễ thực hiện, không tốn kém nhưng kết quả không ổn định và độ chính xác không cao.v.v. Sử dụng chỉ thị SSR để nghiên cứu hệ gen lúa nói chung và lập bản đồ nói riêng là sự lựa chọn hợp lý và tốt nhất; bởi vì chỉ thị SSR dễ thao tác, kết quả chính xác và đối với lúa đã có hàng nghìn chỉ thị sẵn sàng cho sử dụng. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng chỉ thị SSR để nhận dạng ADN phục vụ cho lập bản đồ gen ở lúa.

Qui trình của nghiên cứu này gồm các bước như sau: tạo quần thể F2 từ tổ hợp lai giữa giống lúa bố mẹ là: CR203 (giống lúa nhiễm bệnh đạo ôn điển hình) và giống Dục chiêm, bên cạnh đó tiến hành lây nhiễm đánh giá tính kháng, nhiễm bệnh của những cây lúa F2. Sử dụng chỉ thị phân tử SSR để nhận dạng ADN giữa hai giống lúa bố mẹ để xác định chỉ thị SSR cho đa hình. Sử dụng chỉ thị cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ để nhận dạng ADN ở các cây lúa F2. Dữ liệu nhận dạng ADN và phản ứng bệnh của các cây F2 được kết hợp để phân tích liên kết xác định gen/QTL kháng bệnh.

3.9.1.1. Đánh giá phản ứng bệnh

Kết quả đánh giá phản ứng bệnh trên lá lúa đã cho thấy, giống Dục chiêm có khả năng kháng cao, mức độ phản ứng bệnh trung bình là 1,63 (bảng 27). Trong khi đó giống lúa CR203, biểu hiện là một giống nhiễm bệnh, mức độ phản ứng bệnh trung bình là 7,45. Đối với những cây lúa F2 mức độ kháng từ 0,33 đến 8,67. Tần số kháng của F2 được chỉ ra ở hình 56. Khoảng 2/3 số cây lúa có giá trị đánh giá nhỏ hơn điểm 4, các cây lúa có điểm như vậy được xem như là điểm kháng (R), 1/3 cây lúa còn lại có giá trị cao hơn điểm 4, những cây lúa này được xem là những cây nhiễm bệnh (S). Tỷ lệ giữa cây kháng và nhiễm bệnh xấp xỉ 3:1, tỷ lệ này phù hợp với phân ly lý thuyết (hình 56). Theo kết quả phân tích này ít nhất có một gen kháng chính trong giống lúa Dục chiêm.



Hình 56: Phản ứng bệnh đạo ôn của các giống lúa Dục chiêm, CR203 và các cây F2 được đánh giá theo thang điểm của IRRI

Bảng 26: Phản ứng bệnh của một số giống lúa với các chủng đạo ôn có độc tính cao

Giống lúa	Chủng nấm			
	1*	2*	3*	4*
Chiêm xiêm	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>R</i>
Chiêm khẩu lo	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Chiêm Nghệ An	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Hom Nam Định	<i>S</i>	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Bát đen Thanh Hóa	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Sớm Bắc Giang	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Chăm sai Tây Bắc	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>M</i>
Tám duối Hải Phòng	<i>S</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Tám xoan	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Tám nhỡ Vĩnh Phúc	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>M</i>
Khẩu nở Tây Bắc	<i>S</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Nếp chắc Hòa Bình	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>R</i>
Nếp mùa trắng Hòa Bình	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Dự Di Hưng	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Lộc Thanh Hóa	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Dự chiêm	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Dự cao cây	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Chiêm bắc	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	-
Co39	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
CR203	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>

*1: P06-6, 2: CBN9219-25, 3: IK81-3, 4: V86010. *R*: kháng, *S*: nhiễm, *M*: kháng trung bình, -: không dữ liệu.

Bảng 27: Đánh giá phản ứng bệnh của các giống lúa Dự chiêm, CR203 và các cây lúa F2 với nấm bệnh đạo ôn

Cây lúa bố, mẹ và F2	Phản ứng bệnh	Cây lúa bố, mẹ và F2	Phản ứng bệnh	Cây lúa bố, mẹ và F2	Phản ứng bệnh	Cây lúa bố, mẹ và F2	Phản ứng bệnh
1	1.00	39	0.33	77	1.00	115	8.00
2	2.00	40	0.33	78	2.33	116	6.00
3	0.67	41	1.67	79	0.33	117	7.00
4	2.00	42	2.67	80	0.67	118	5.00

5	2.67	43	2.00	81	1.67	119	4.67
6	1.00	44	2.33	82	1.33	120	4.33
7	0.33	45	2.00	83	1.00	121	8.00
8	2.00	46	3.00	84	1.67	122	8.67
9	2.33	47	2.33	85	1.33	123	7.00
10	1.33	48	1.00	86	1.67	124	7.00
11	1.00	49	2.00	87	2.33	125	4.00
12	1.33	50	1.33	88	2.33	126	8.00
13	1.00	51	0.33	89	1.00	127	6.33
14	0.67	52	1.00	90	2.00	128	8.67
15	1.00	53	2.00	91	2.00	129	4.33
16	0.33	54	0.33	92	2.00	130	7.00
17	2.33	55	1.67	93	1.00	131	6.00
18	2.00	56	2.67	94	3.00	132	6.33
19	1.00	57	2.33	95	2.00	133	3.67
20	3.00	58	2.67	96	1.00	134	7.33
21	2.00	59	2.67	97	2.00	135	8.67
22	1.00	60	3.00	98	0.67	136	7.00
23	0.33	61	2.00	99	2.00	137	7.33
24	0.33	62	1.00	100	3.00	138	7.00
25	1.67	63	1.00	101	1.00	139	5.67
26	2.67	64	1.67	102	0.33	140	3.67
27	2.00	65	1.33	103	2.00	141	8.33
28	1.00	66	2.33	104	1.67	142	6.00
29	2.33	67	0.33	105	1.33	143	7.33
30	1.33	68	0.33	106	1.00	144	4.33
31	1.67	69	2.00	107	1.00	145	4.33
32	1.67	70	1.33	108	1.00	146	7.00
33	2.00	71	2.00	109	2.00	147	8.33
34	2.67	72	2.33	110	1.00	148	3.67
35	2.33	73	1.33	111	2.33	149	7.67
36	2.33	74	2.33	112	2.00	150	5.67
37	0.67	75	1.67	113	7.33	Dự chiêm	1.63
38	1.00	76	1.67	114	6.33	CR203	7.45

3.9.1.2. Xây dựng bản đồ liên kết

195 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể của lúa đã được sử dụng để phân tích đa hình giữa 2 giống lúa Dự chiêm và CR203 (hình 57). 116 chỉ thị đã cho đa hình giữa 2 giống lúa nói trên (bảng 28), chiếm tỷ lệ khoảng 60%.

116 chỉ thị phân tử cho đa hình giữa hai giống lúa đã được sử dụng để nhận dạng ADN ở F2 (hình 58). Kiểu nhận dạng ADN của giống Dự chiêm được mã là: A, của giống CR203 mã là: B, những cây F2 có nhận dạng giống nhận dạng ADN của giống Dự chiêm được mã là A, giống nhận dạng ADN của giống CR203 được mã là: B và những cây dị hợp tử (có nhận dạng ADN giữa giống Dự chiêm và CR203) được mã là: H. Dữ

liệu ADN của cây bố, mẹ và cây F2 được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết của các chỉ thị phân tử, sử dụng chương trình MAPMAKER/EXP.

Trên bản đồ liên kết các chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể với tổng khoảng cách là 749,1cM, khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 6,46cM, khoảng cách xa nhất giữa hai chỉ thị là 23,5cM và gần nhất là 0,7cM (hình 59). Trật tự sắp xếp của các chỉ thị phân tử SSR trên mỗi nhiễm sắc thể ở nghiên cứu này cũng tương xứng với trật tự sắp xếp của các chỉ thị SSR trên bản đồ liên kết ở lúa đã được McCouch và cs. (2002) và Chương trình genome lúa công bố.

Bảng 28: Chỉ thị SSR cho đa hình giữa giống Dục chiêm và CR203 được sử dụng để nhận dạng ADN ở các cây F2 và xác định gen/QTL kháng đạo ôn

Chỉ thị SSR	Nhiễm sắc thể (NST)	Định vị trên NST	Chỉ thị SSR	Nhiễm sắc thể (NST)	Định vị trên NST	Chỉ thị SSR	Nhiễm sắc thể (NST)	Định vị trên NST
RM06672	1	0.3	RM06815	4	19.6	RM05799	9	0.8
RM01320	1	10.9	RM05688	4	30.8	RM05526	9	30.2
RM05302	1	20.2	RM06314	4	41.5	RM06444	9	36
RM08146	1	25.5	RM01359	4	56.1	RM06854	9	49.3
RM01201	1	36.9	RM03524	4	68.3	RM01189	9	58.3
RM00579	1	43.4	RM02439	4	70.1	RM04405	9	65.1
RM08133	1	50.5	RM03529	5	3	RM06460	9	70.1
RM03412	1	62.5	RM02010	5	12	RM05403	9	75.4
RM08003	1	78.1	RM05579	5	20.85	RM01099	9	91.5
RM05497	1	90.45	RM06517	5	25	RM03744	9	93.5
RM03642	1	103.1	RM05541	5	36.4	RM06364	10	0
RM07414	1	114.1	RM02676	5	54.6	RM06646	10	13.3
RM05931	1	122.9	RM08116	6	1.6	RM04455	10	22.3
RM06387	1	134.7	RM04332	6	3.6	RM01859	10	30.9
RM08084	1	140.5	RM03463	6	9.8	RM03229	10	42.7
RM01198	1	146.4	RM05199	6	10.4	RM01873	10	48.8
RM02770	2	0	RM02615	6	15.8	RM06150	10	51.5
RM06151	2	8.6	RM04173	6	32.7	RM05841	10	57.5
RM05654	2	15	RM04128	6	35.8	RM05352	10	71.1
RM04355	2	19	RM06194	6	38.95	RM06673	10	83.8
RM05862	2	30.2	RM05850	6	52.95	RM06160	10	94.1
RM02468	2	36.3	RM03560	6	59.05	RM01761	11	0.3
RM06911	2	42.4	RM05087	6	65.8	RM02459	11	9.2
RM06662	2	50.3	RM04584	7	2.5	RM01124	11	19.8
RM04180	3	1.1	RM05752	7	11	RM05704	11	28.6
RM03807	3	16.8	RM06963	7	24.8	RM03625	11	34.8
RM06038	3	24.7	RM06338	7	41.7	RM02020	11	57.3
RM03441	3	31	RM03449	7	50	RM03083	11	64.2
RM05896	3	40.3	RM06427	7	60.8	RM05731	11	65.5
RM05955	3	49.3	RM02966	7	69.2	RM02859	11	89
RM06929	3	59.5	RM03534	7	80.5	RM06335	12	7.4
RM06676	3	66.2	RM01306	7	93.3	RM01880	12	9.4
RM03513	3	71.3	RM06369	8	0.5	RM06288	12	13.3
RM02346	3	87.1	RM08005	8	12.8	RM07003	12	41.8

RM02593	3	102.6	RM04955	8	24.5	RM02529	12	47.6
RM03844	3	120.4	RM02420	8	24.9	RM01246	12	65.3
RM06817	3	144.5	RM06421	8	36.8	RM07102	12	71.85
RM02187	3	156.3	RM02584	8	45.8	RM06605	12	75.8
RM03892	4	6.8	RM06382	8	58.4			

Các nhiễm sắc thể: số 1 có số lượng chỉ thị là 16, với khoảng cách là 134,4cM; số 2 có số lượng chỉ thị là 8, với khoảng cách là 35,6cM; số 3 có số lượng chỉ thị là 14, với khoảng cách là 97,6cM; số 4 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 48,3cM; số 5 có số lượng chỉ thị là 6, với khoảng cách là 39,9cM; số 6 có số lượng chỉ thị là 11, với khoảng cách là 38,1cM; số 7 có số lượng chỉ thị là 9, với khoảng cách là 64,1cM; số 8 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 37cM; số 9 có số lượng chỉ thị là 10, với khoảng cách là 57,7cM; số 10 có số lượng chỉ thị là 11, với khoảng cách là 64,1cM; số 11 có số lượng chỉ thị là 9, với khoảng cách là 73,5cM và số 12 có số lượng chỉ thị là 8, với khoảng cách là 58,8cM. Liên kết và trật tự sắp xếp của các chỉ thị phân tử SSR được thể hiện chi tiết trong bản đồ liên kết (hình 59).

3.9.1.3. Phân tích xác định gen (QTL)

Dữ liệu kiểu gen (nhận dạng ADN) và phản ứng bệnh (hình 59) đã được sử dụng để phân tích xác định vị trí gen sử dụng chương trình MAPMAKER/QTL ver.1.1.

Bảng 29: Các QTL được phát hiện liên quan đến tính kháng đạo ôn lá

QTL	Chỉ thị SSR biên	Nhiễm sắc thể	AE ^a	LOD	Var. exp. (%) ^b
<i>qBLASTp-1-DT</i>	RM0579-RM8133	1	- 0.096	2,943	9,2
<i>qBLASTp-3-DT</i>	RM5955-RM6929	3	- 0.151	3,185	10
<i>qBLASTp-9-DT</i>	RM5799-RM5526	9	- 0.116	3,478	13,5
<i>qBLASTp-10-DT</i>	RM6150-RM5841	10	- 0.007	3,135	9,5

^a Hiệu quả di truyền tăng thêm do sự tương tác giữa 2 allen của giống Dục chiêm và CR203.

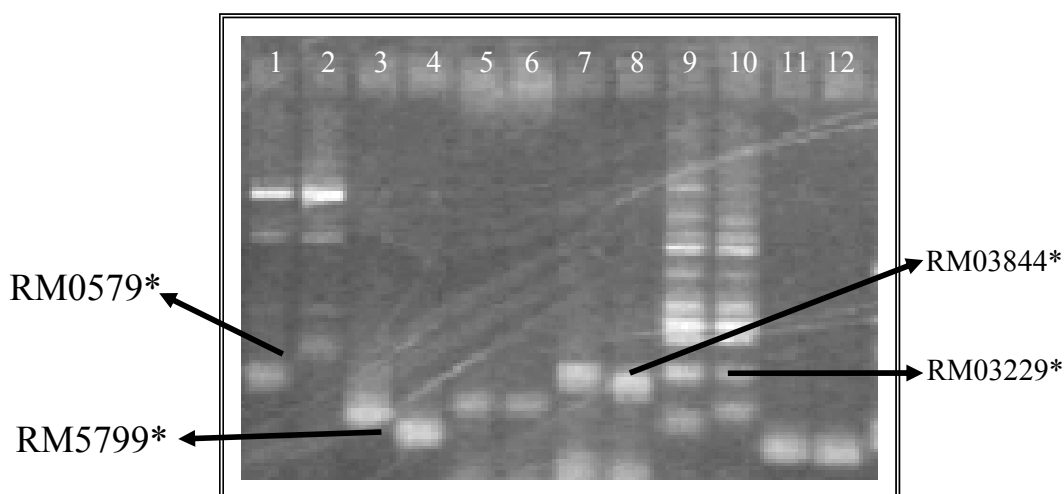
AE có giá trị âm có nghĩa là allen làm tăng khả năng kháng bệnh đến từ giống CR203.

^b Đóng góp của QTL lên khả năng kháng bệnh.

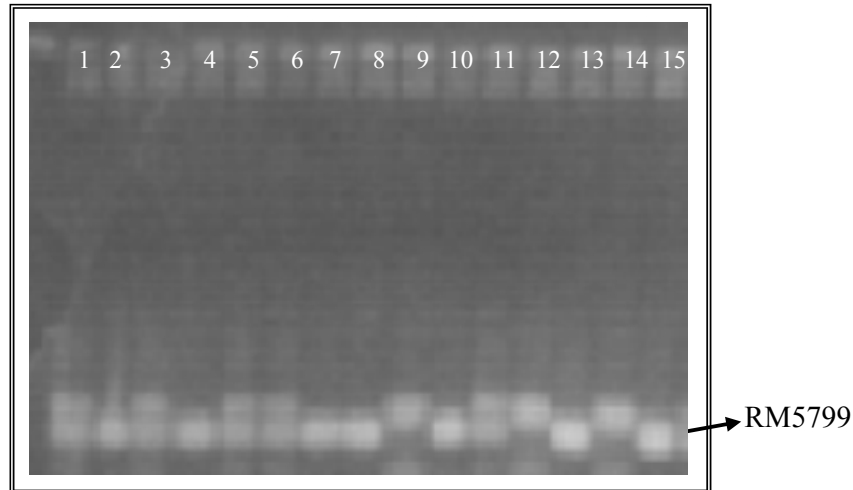
qBLASTl-3-DT có nghĩa là QTL liên quan đến bệnh đạo ôn lá, nằm trên nhiễm sắc thể số 3; *q*: là QTL, *BLAST*: là đạo ôn, *l*: là lá, *3*: là nhiễm sắc thể số 3 và *DT* là viết tắt của cụm từ “di truyền”.

Kết quả phân tích đã xác định được 4 QTL có chỉ số LOD (log-likelihood) lớn hơn 2; như vậy đã có 4 vị trí chứa gen qui định tính kháng đạo ôn trong quần thể F2 tạo lập giữa giống Dục chiêm và CR203. Các thông số: giá trị LOD, phần trăm tác động, vị trí nhiễm sắc thể và chỉ thị SSR biên (liên kết gần) của các vị trí mang gen QTL được thể hiện trong bảng 26. Các vị trí mang gen được đặt tên: *qBLAST-1-DT*, *qBLAST-3-*

DT, qBLAST-9-DT và qBLAST-10-DT. Cả 4 QTL phát hiện được đều có giá trị AE âm, thể hiện giống CR203 đã đóng góp allel làm tăng tính kháng đạo ôn, như vậy mặc dù là giống lúa nhiễm bệnh nhưng khi có sự tương tác allel với giống kháng Dục chiêm nó góp phần làm tăng tính kháng bệnh trong quần thể. Trong số các QTL đã được phát hiện, qBLAST-9-DT có chỉ số LOD là 3,478 và có phần trăm đóng góp tới kiểu hình là chiếm 13,2%, chỉ số này lớn hơn các QTL khác, điều này chứng tỏ nó đóng vai trò chính qui định tính kháng đạo ôn và cũng phù hợp với kết quả phân tích phản ứng bệnh cho thấy có ít nhất một gen kháng chính qui định tính kháng đạo ôn ở giống Dục chiêm.



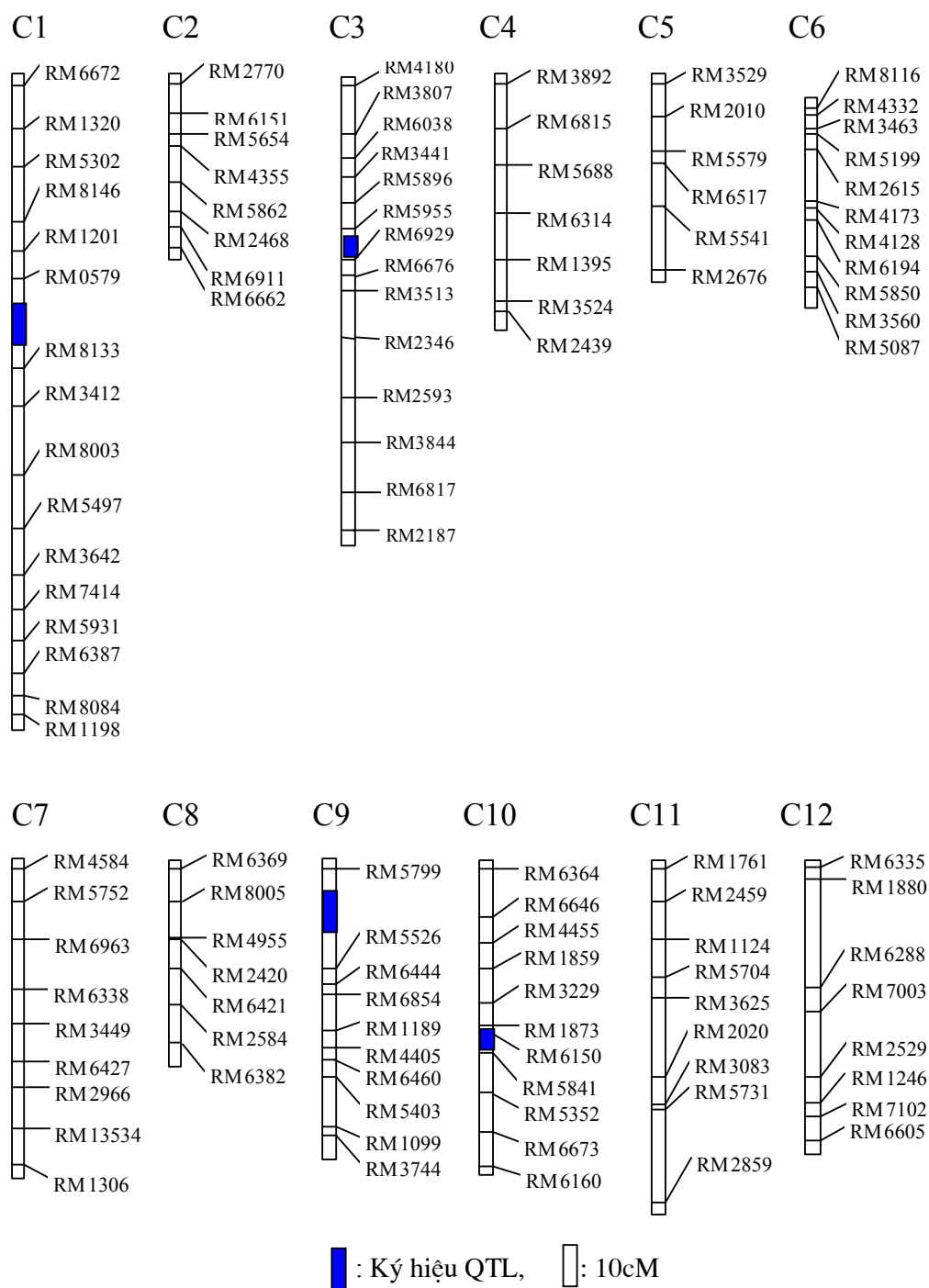
Hình 57: Nhận dạng ADN để xác định sự đa hình giữa hai giống lúa Dục chiêm và CR203 bằng các cặp mồi SSR khác nhau. Các cột 1, 3, 5, 7, 9, 11 là giống Dục chiêm; các cột 2, 4, 6, 8, 10 và 12 là giống CR203; * Chỉ thị cho đa hình giữa hai giống lúa Dục chiêm và CR203



Hình 58: Nhận dạng ADN của những cây lúa bố, mẹ và các cây F2 với mỗi SSR cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ. Cột 14 là giống lúa Dự chiêm, cột 15 là giống lúa CR203, các cột còn lại từ 1 đến 13 là những cây lúa F2

Qua tiến hành phân tích phản ứng bệnh đạo ôn, phân tích kiểu gen của các giống lúa Dự chiêm, CR203 và thế hệ F2 của chúng, kết hợp với phân tích liên kết sử dụng chương trình MAPMAKER/EXP ver 3.0 và MAPMAKER/QTL 1.1 đã xây dựng được bản đồ liên kết các chỉ thị SSR và xác định được các QTL qui định tính kháng đạo ôn cụ thể như sau:

1. Đã xác định được 116 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể lúa cho đa hình giữa giống Dự chiêm và CR203 và xây dựng được bản đồ liên kết của 116 chỉ thị với tổng chiều dài là 749,1cM và khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 6,46cM.
2. Đã xác định được 4 QTL kháng đạo ôn và bản đồ của chúng gồm các QTL: qBLASTp-1-DT; qBLASTp-3-DT; qBLASTp-9-DT; qBLASTp-10-DT. Chỉ thị liên kết gần ở hai đầu QTL tương ứng là RM0579-RM8133; RM5955-RM6929; RM5799-RM5526 và RM6150-RM5841.
3. QTL: qBLAST-9-DT có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp tới kiểu hình cao nhất trong số các QTL được xác định, đây là QTL chính tác động lên tính kháng đạo ôn ở lúa.



Hình 59: Bản đồ liên kết chỉ thị phân tử SSR và các QTL kháng đạo ôn được xác định qua phân tích quần thể F₂ của tổ hợp lai giữa giống lúa Dực chiêm và CR203

3.9.2. Kết quả nghiên cứu lập bản đồ gen chịu hạn ở lúa LC 93-1

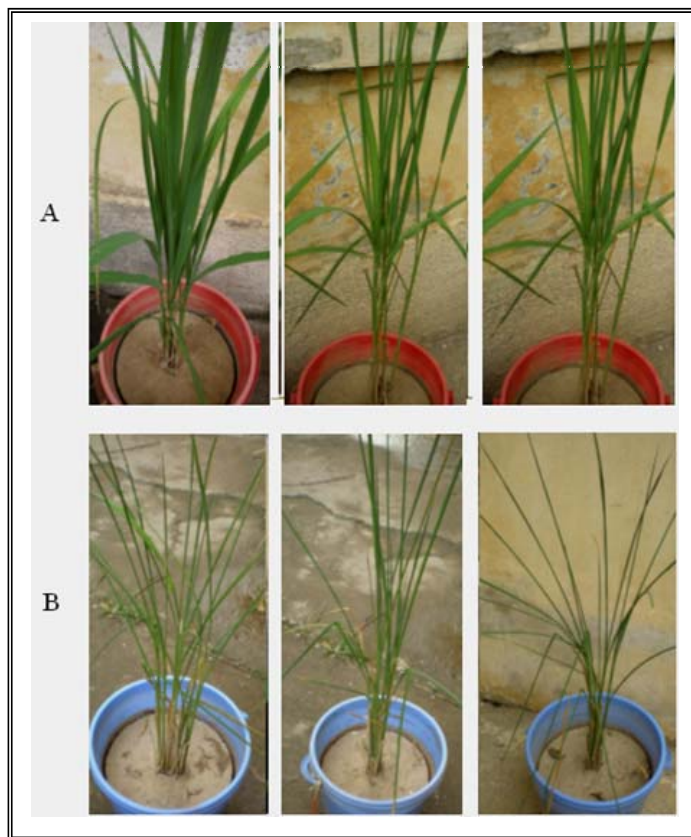
Chịu hạn là một đặc tính nông học quý của bất cứ loài cây trồng nào, nhờ có khả năng chịu hạn tốt mà cây trồng có thể chống chịu được với điều kiện khô hạn kéo dài của thời tiết. Đặc tính chịu hạn của lúa đang được các nhà chọn tạo giống tập trung khai thác nhằm tạo ra các giống lúa có khả năng chịu hạn tốt trong các điều kiện khô hạn cũng như vùng đồi, núi cao nhưng muốn khai thác tốt được tính trạng này thì cần phải phân tích lập bản đồ gen của chúng.

Ở nước ta có rất nhiều giống lúa có khả năng chịu hạn tốt như các giống: Tẻ mè, Lộc Nghệ An, Nếp nương, LC93-1, CH5, CH133, CH3.v.v. các giống lúa này là vật liệu quý để khai thác nguồn gen chịu hạn trong chọn tạo giống. Tuy vậy, những nghiên cứu phân tích phân tử ở mức độ ADN đối với nguồn gen chịu hạn của lúa còn rất khiêm tốn và vẫn chưa có công bố nào về lập bản đồ gen/QTL của các giống lúa nói trên. Trong số các giống lúa có nguồn gen chịu hạn thì giống LC93-1 đang được triển khai rộng trong sản xuất, giống lúa này vừa có khả năng chịu hạn tốt vừa có năng suất cao. Chính vì vậy để khai thác một cách hiệu quả nhất khả năng chống chịu của giống LC93-1, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành lập bản đồ gen/QTL qui định tính chịu hạn của nó. Chúng tôi đã tạo quần thể F2 nhằm nhanh chóng xác định các gen/QTL chịu hạn trên bản đồ nhiễm sắc thể của lúa. Và chúng tôi đã sử dụng chỉ thị SSR để nhận dạng ADN phục vụ cho lập bản đồ gen ở lúa.

Để phân tích xác định các gen/QTL chịu hạn ở lúa, tùy theo mỗi điều kiện nghiên cứu khác nhau mà người ta sẽ quan tâm tới các chỉ tiêu trong số 21 chỉ tiêu liên quan đến điều kiện bị khô hạn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan tâm tới hai chỉ tiêu đó là: mức độ khô của lá lúa hay độ cuộn lá lúa (LDS, leaf-drying score) và thời gian (ngày) lá lúa cuộn hoàn toàn (DLR, No. of days to leaf rolling) trong điều kiện bị khô hạn.

Qui trình của nghiên cứu này gồm các bước như sau: tạo quần thể F2 từ tổ hợp lai giữa giống lúa bố mẹ là: Khang dân 18 (giống lúa có khả năng chịu hạn kém) và giống LC93-1 (giống lúa có khả năng chịu hạn tốt). Sau đó thiết kế thí nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của các cây F2, bên cạnh đó sử dụng chỉ thị phân tử SSR để nhận dạng ADN giữa hai giống lúa bố mẹ để xác định chỉ thị SSR cho đa hình và sử dụng chỉ thị cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ để nhận dạng ADN ở các cây lúa F2. Dữ liệu nhận dạng ADN và đánh giá chịu hạn của các cây F2 được kết hợp để phân tích liên kết xác định gen/QTL chịu hạn.

3.9.2.1. Đánh giá khả năng chịu hạn

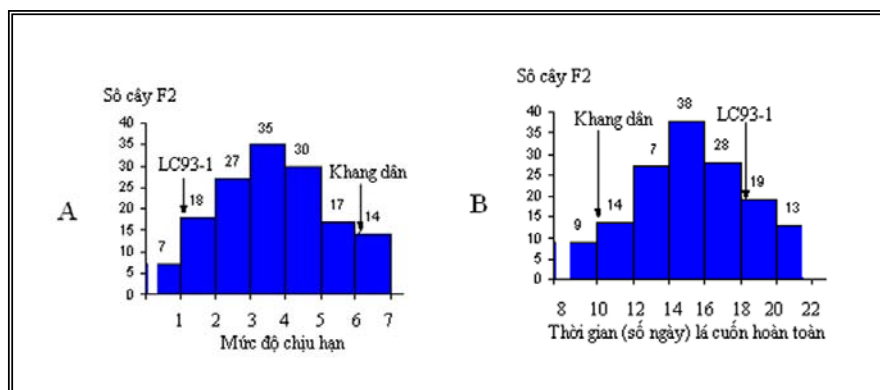


*Hình 60: Thế hệ F2 sau khi bị gây khô hạn
A: sau 14 ngày gây khô hạn, B: sau 21 ngày gây khô hạn*

Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của các giống lúa đã cho thấy giống LC93-1 biểu hiện tính chịu hạn khá tốt, chỉ số LDS sau 7 ngày tạo khô hạn là 1,33 và chỉ số DLR là 18 ngày; trong khi đó giống Khang dân 18 cho thấy chịu hạn kém với chỉ số LDS là 6,33 và DLR là 10 ngày (bảng 30, 31). Đối với những cây lúa F2 có khả năng chịu hạn ở các cấp độ khác nhau (hình 60) và chỉ số LDS từ 0,33 đến 7 và chỉ số DLR là 8,33 đến 21,67. Tần số các cây F2 với khả năng chịu hạn được chỉ ra ở hình 61.

Sau khi tạo hạn 7 ngày, số cây F2 có độ cuộn lá như sau: 7 cây có mức độ cuộn lá từ 0,33 đến 1; 18 cây ở mức độ từ 1 đến 2; 27 cây ở mức độ từ 2 đến 3; 35 cây ở mức độ từ 3 đến 4; 30 cây ở mức độ từ 4 đến 5; 17 cây ở mức độ cuộn lá từ 5 đến 6 và 14 cây ở mức độ cuộn lá từ 6 đến 7 (hình 61A). Số cây F2 cuộn lá hoàn toàn sau khi tạo hạn như sau: 9 cây cuộn lá hoàn toàn sau 8,33 đến 10 ngày; 14 cây sau 10 đến 12 ngày; 7 cây sau 12 đến 14 ngày; 38 cây sau 14 đến 16 ngày; 28 cây sau 16 đến 18 ngày; 19 cây sau 18 đến 20 ngày và 13 cây sau 20 đến 21,67 ngày (hình 61B). Như vậy với tần số của các cây F2 ở cả hai trường hợp độ cuộn lá (hình 61A) và thời gian lá cuộn hoàn toàn (hình 61B) sau khi tạo khô hạn, cả hai đồ thị trên đều có dạng phân bố hình chuông.

Như vậy kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng chịu hạn với cả hai chỉ số độ cuộn lá và thời gian cuộn lá hoàn toàn là các tính trạng định lượng do đa gen qui định.



Hình 61: Khả năng chịu hạn về chỉ số độ cuộn lá của các cây lúa F2

A: độ cuộn của lá sau 7 ngày tạo khô hạn,

B: thời gian (ngày) lá cuộn hoàn toàn sau khi tạo khô hạn

Bảng 30: Kết quả đánh giá tính chịu hạn thông qua chỉ số LDS sau 7 ngày tạo hạn đối với cây lúa bố mẹ (Khang dân 18, LC93-3) và F2

Cây lúa bố, mẹ và F2	Chỉ số LDS	Cây lúa bố, mẹ và F2	Chỉ số LDS	Cây lúa bố, mẹ và F2	Chỉ số LDS	Cây lúa bố, mẹ và F2	Chỉ số LDS
1	2.33	39	5.00	77	2.33	115	4.33
2	3.67	40	3.67	78	3.67	116	1.67
3	1.33	41	6.33	79	5.67	117	7.00
4	3.67	42	3.00	80	4.33	118	4.33
5	5.67	43	4.33	81	4.33	119	3.00
6	2.33	44	3.00	82	3.67	120	2.33
7	1.33	45	2.33	83	3.67	121	2.33
8	0.33	46	3.00	84	1.00	122	4.33
9	4.33	47	3.67	85	1.00	123	3.67
10	2.33	48	4.33	86	3.00	124	2.33
11	1.33	49	6.33	87	3.67	125	2.33
12	4.33	50	1.67	88	5.67	126	3.67
13	5.67	51	0.33	89	2.00	127	3.00
14	2.00	52	3.67	90	3.00	128	5.67
15	2.33	53	4.33	91	4.33	129	1.67
16	4.33	54	2.33	92	1.33	130	3.00
17	2.33	55	3.67	93	5.00	131	4.33
18	3.67	56	3.00	94	3.00	132	5.67
19	3.00	57	6.33	95	0.67	133	3.67
20	0.67	58	6.33	96	1.00	134	2.00
21	4.33	59	1.67	97	5.67	136	6.33
22	4.33	60	2.33	98	6.33	135	5.67
23	5.67	61	4.67	99	4.33	136	6.33
24	3.67	62	5.67	100	6.33	137	1.00
25	2.33	63	3.67	101	4.33	138	2.33
26	1.67	64	3.67	102	4.33	139	2.33
27	3.67	65	4.33	103	0.33	140	2.33

28	0.33	66	4.33	104	2.33	141	3.00
29	4.33	67	6.33	105	5.00	142	4.33
30	3.67	68	1.67	106	6.33	143	3.67
31	6.33	69	2.33	107	6.33	144	1.00
32	2.33	70	5.67	108	2.33	145	5.67
33	4.33	71	3.00	109	3.67	146	2.33
34	1.67	72	5.67	110	4.33	147	4.33
35	0.67	73	6.33	111	1.33	148	4.33
36	3.00	74	5.67	112	4.33	Khang dân	6.33
37	4.33	75	4.33	113	6.33	LC93-1	1.33
38	1.33	76	2.33	114	2.33		

Bảng 31: Kết quả đánh giá tính chịu hạn thông qua chỉ số DLR sau khi tạo hạn đối với cây lúa bố mẹ (Khang dân 18, LC93-3) và F2

Cây lúa bố, mẹ và	Chỉ số DLR	Cây lúa bố, mẹ và	Chỉ số DLR	Cây lúa bố, mẹ và	Chỉ số DLR	Cây lúa bố, mẹ và	Chỉ số DLR
1	8.33	39	13.33	77	15.33	115	17.67
2	8.33	40	13.33	78	15.33	116	17.67
3	8.67	41	13.33	79	15.33	117	18.00
4	8.67	42	13.33	80	15.33	118	18.00
5	9.00	43	13.33	81	15.33	119	18.33
6	9.33	44	13.33	82	15.67	120	18.33
7	9.67	45	13.67	83	15.67	121	18.33
8	9.67	46	13.67	84	15.67	122	18.67
9	9.67	47	13.67	85	15.67	123	18.67
10	10.00	48	13.67	86	15.67	124	19.00
11	10.00	49	13.67	87	15.67	125	19.00
12	10.67	50	13.67	88	15.67	126	19.33
13	10.67	51	14.00	89	16.00	127	19.33
14	10.67	52	14.00	90	16.00	128	19.33
15	10.67	53	14.00	91	16.00	129	19.33
16	11.00	54	14.00	92	16.00	130	19.33
17	11.00	55	14.00	93	16.00	131	19.33
18	11.00	56	14.00	94	16.00	132	19.67
19	11.33	57	14.00	95	16.33	133	19.67
20	11.33	58	14.33	96	16.33	134	19.67
21	11.67	59	14.33	97	16.33	135	19.67
22	11.67	60	14.33	98	16.33	136	20.00
23	11.67	61	14.33	99	16.33	137	20.00
24	12.00	62	14.33	100	16.67	138	20.00
25	12.00	63	14.67	101	16.67	139	20.00
26	12.00	64	14.67	102	16.67	140	20.67
27	12.00	65	15.00	103	16.67	141	20.67
28	12.33	66	15.00	104	17.00	142	21.00
29	12.33	67	15.00	105	17.00	143	21.00
30	12.67	68	15.00	106	17.00	144	21.00
31	12.67	69	15.00	107	17.33	145	21.33
32	12.67	70	15.00	108	17.33	146	21.33
33	12.67	71	15.00	109	17.33	147	21.67
34	13.00	72	15.00	110	17.33	148	21.67

35	13.00	73	15.33	111	17.67	LC93-1	18
36	13.00	74	15.33	112	17.67	Khang	10
37	13.00	75	15.33	113	17.67		
38	13.00	76	15.33	114	17.67		

3.9.2.2. Xây dựng bản đồ liên kết

183 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể của lúa đã được sử dụng để phân tích đa hình giữa 2 giống lúa LC93-1 và Khang dân 18 (hình 62). 97 chỉ thị đã cho đa hình giữa 2 giống lúa nói trên, chiếm tỷ lệ khoảng 53% (bảng 32).

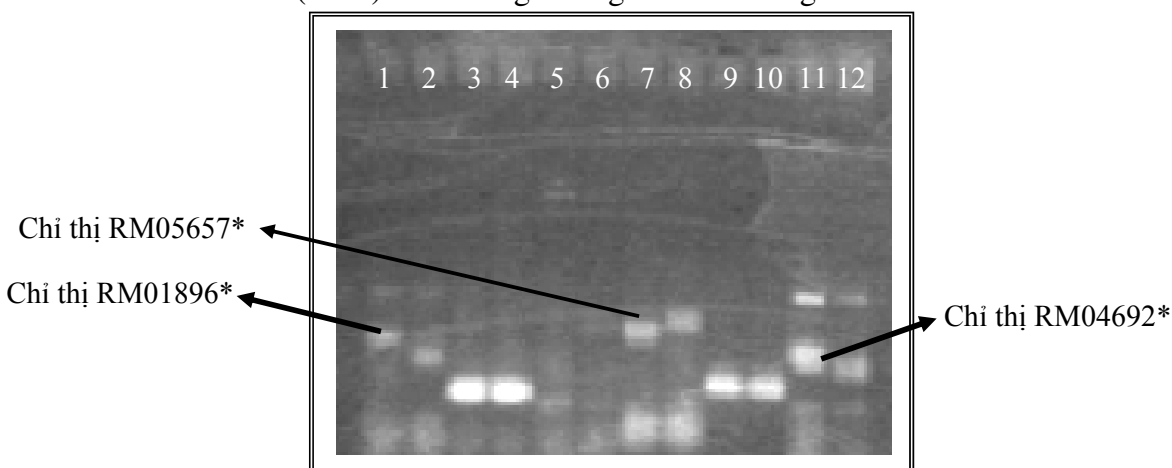
Bảng 32: Các chỉ thị SSR cho đa hình ADN giữa hai giống lúa Khang dân 18 và LC93-1 được sử dụng để lập bản đồ gen chịu hạn

TT	Chỉ thị SSR	Định vị trên nhiễm sắc thể (NST)	Vị trí trên NST	TT	Chỉ thị SSR	Định vị trên nhiễm sắc thể (NST)	Vị trí trên NST
1	RM03252	1	0.3	50	RM03187	6	73.2
2	RM05302	1	20.2	51	RM03628	6	85.4
3	RM03174	1	26.8	52	RM06782	6	99.2
4	RM01201	1	36.9	53	RM06926	6	113.1
5	RM08148	1	43.4	54	RM01150	6	121.7
6	RM08133	1	50.5	55	RM03876	6	124.4
7	RM08095	1	60.6	56	RM05211	7	2.5
8	RM08003	1	78.1	57	RM07012	7	11
9	RM01313	1	89.4	58	RM03918	7	24.8
10	RM03642	1	103.1	59	RM03449	7	50
11	RM03304	1	116	60	RM06767	7	60.8
12	RM06387	1	134.7	61	RM02966	7	69.2
13	RM02770	2	0	62	RM01306	7	93.3
14	RM06077	2	8.9	63	RM06369	8	0.5
15	RM03703	2	17.9	64	RM01789	8	12.8
16	RM05862	2	30.2	65	RM04955	8	24.5
17	RM06853	2	42.1	66	RM07013	8	36.8
18	RM06844	2	58.4	67	RM08042	8	45.8
19	RM02634	2	80.5	68	RM06382	8	58.4
20	RM04180	3	1.1	69	RM05799	9	0.8
21	RM02421	3	16.8	70	RM05526	9	30.2
22	RM03441	3	31	71	RM01896	9	36
23	RM05140	3	49.3	72	RM05657	9	49.3
24	RM06929	3	59.5	73	RM01189	9	58.3
25	RM06676	3	66.2	74	RM04692	9	65.1
26	RM05864	3	88.95	75	RM06460	9	70.1
27	RM02593	3	102.6	76	RM05403	9	75.4
28	RM06053	3	120.4	77	RM02144	9	91.5
29	RM06781	3	139.8	78	RM03311	10	19
30	RM05412	4	6.8	79	RM06124	10	30.9
31	RM05953	4	19.9	80	RM03229	10	42.7
32	RM05688	4	30.8	81	RM06150	10	51.5
33	RM06314	4	41.5	82	RM02371	10	57.5
34	RM07396	4	56.1	83	RM05352	10	71.1
35	RM05221	4	70.1	84	RM03123	10	86.45
36	RM02439	4	70.1	85	RM05768	10	94.1
37	RM06057	4	85.4	86	RM07557	11	9.2
38	RM01153	4	113.2	87	RM01124	11	19.8
39	RM01248	5	3	88	RM07484	11	28.6
40	RM05796	5	12	89	RM03137	11	32.7
41	RM06517	5	25	90	RM02020	11	57.3

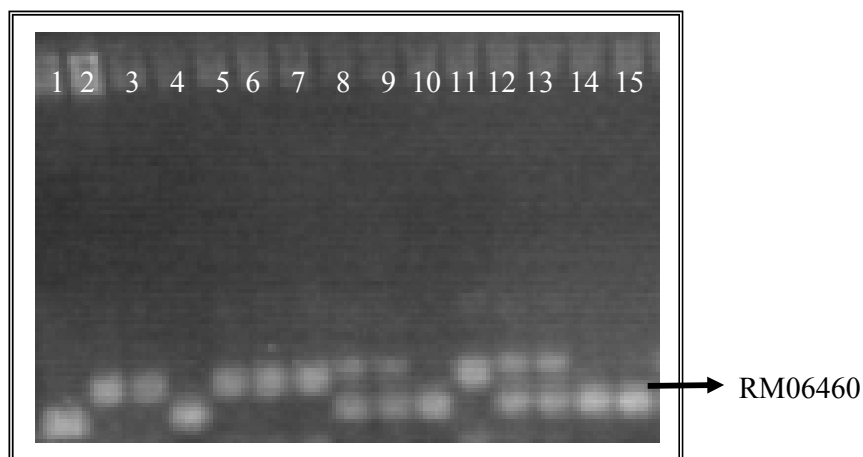
42	RM05541	5	36.4	91	RM04862	11	65.5
43	RM06229	5	55.2	92	RM05961	11	79.9
44	RM03969	5	73.9	93	RM01880	12	9.4
45	RM05642	5	91.2	94	RM06288	12	13.3
46	RM08116	6	1.6	95	RM07119	12	41.8
47	RM07561	6	15.8	96	RM02529	12	47.6
48	RM05981	6	33.5	97	RM05195	12	65.3
49	RM02523	6	53.5				

97 chỉ thị phân tử cho đa hình giữa hai giống lúa đã được sử dụng để nhận dạng ADN ở F2 (hình 63). Kiểu nhận dạng ADN của giống LC93-1 được mã là: A, của giống Khang dân 18 mã là: B, những cây F2 có nhận dạng giống nhận dạng ADN của giống LC93-1 được mã là A, giống nhận dạng ADN của giống Khang dân 18 được mã là: B và những cây dị hợp tử (có nhận dạng ADN giữa các giống LC93-1 và Khang dân 18) được mã là: H. Dữ liệu ADN của cây bố, mẹ và cây F2 hai được sử dụng để xây dựng bản đồ liên kết của các chỉ thị phân tử, sử dụng chương trình MAPMAKER/EXP ver 3.0.

Trên bản đồ liên kết các chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể với tổng khoảng cách là 993,2cM, khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 10,24cM, khoảng cách xa nhất giữa hai chỉ thị là 29cM và gần nhất là 2,4cM (hình 63). Trật tự sắp xếp của các chỉ thị phân tử SSR trên mỗi nhiễm sắc thể ở nghiên cứu này cũng tương xứng với trật tự sắp xếp của các chỉ thị SSR trên bản đồ liên kết ở lúa đã được McCouch và cs. (2002) và Chương trình genom lúa công bố.



Hình 62: Nhận dạng ADN để xác định sự đa hình giữa hai giống lúa Dự chiêm và CR203 bằng các cặp môi SSR khác nhau. Các cột 1, 3, 5, 7, 9, 11 là giống Khang dân 18; các cột 2, 4, 6, 8, 10 và 12 là giống LC93-1; *Chỉ thị cho đa hình giữa hai giống lúa bố/mẹ



Hình 63: Nhận dạng ADN của những cây lúa bố mẹ và F2 với mỗi SSR cho đa hình giữa hai giống lúa bố mẹ. Cột 1 là giống lúa CL93-1, cột 2 là giống lúa Khang dân 18, các cột còn lại từ 1 đến 13 là những cây lúa F2

Các nhiễm sắc thể: số 1 có số lượng chỉ thị là 12, với khoảng cách là 100cM; số 2 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 58,3cM; số 3 có số lượng chỉ thị là 10, với khoảng cách là 127,4cM; số 4 có số lượng chỉ thị là 9, với khoảng cách là 109,4cM; số 5 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 90,3cM; số 6 có số lượng chỉ thị là 10, với khoảng cách là 111,1cM; số 7 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 80,3cM; số 8 có số lượng chỉ thị là 6, với khoảng cách là 68,4cM; số 9 có số lượng chỉ thị là 9, với khoảng cách là 67,7cM; số 10 có số lượng chỉ thị là 8, với khoảng cách là 65,9cM; số 11 có số lượng chỉ thị là 7, với khoảng cách là 76,5cM và số 12 có số lượng chỉ thị là 5, với khoảng cách là 37,9cM. Liên kết và trật tự sắp xếp của các chỉ thị phân tử SSR được thể hiện chi tiết trong bản đồ liên kết (hình 64).

3.9.2.3. Phân tích xác định QTL

Dữ liệu kiểu gen (nhận dạng ADN) và khả năng chịu hạn đã được sử dụng để phân tích xác định vị trí QTL sử dụng chương trình MAPMAKER/QTL ver.1.1. Kết quả phân tích đã xác định được 12 QTL liên quan đến độ cuộn lá và thời gian lá cuộn hoàn toàn (bảng 33, 34 và hình 64).

5 QTL có chỉ số LOD lớn hơn 3 liên quan đến độ cuộn của lá (bảng 32). Các thông số: giá trị LOD, phần trăm tác động lên kiểu hình, vị trí nhiễm sắc thể và chỉ thị SSR biên (liên kết gần) của các QTL được thể hiện trong bảng 1. Các QTL được đặt tên: qDroughtLDS-1-DT, qDroughtLDS-3-DT, qDroughtLDS-8-DT, qDroughtLDS-9-DT, qDroughtLDS-10-DT. Các QTL có chỉ số LOD từ 3,36 đến 4,35 và đóng góp của QTL

lên khả năng chịu hạn (kiểu hình) từ 10,1% đến 12,7%. Trong số các QTL đã được phát hiện, qDroughtLDS-9-DT có chỉ số LOD là 4,14 và có phần trăm đóng góp tới kiểu hình chiếm 12,9%, các chỉ số này lớn hơn các QTL khác, như vậy nó có thể được xem là QTL chính qui định tính chịu hạn. Trong số 5 QTL: qDroughtLDS-1-DT và qDroughtLDS-8-DT có allel làm tăng khả năng chịu hạn đến từ giống lúa LC93-1 và các QTL còn lại có allel đến từ giống lúa Khang dân 18 (bảng 33).

7 QTL đã được phát hiện liên quan đến số ngày cây lúa F2 cuốn lá hoàn toàn sau khi bị tạo khô hạn (bảng 33). Các QTL được đặt tên là: qDroughtDLR-1-DT, qDroughtDLR-1-DT, qDroughtDLR-3-DT, qDroughtDLR-6-DT, qDroughtDLR-8-DT, qDroughtDLR-9-DT và qDroughtDLR-10-DT cùng với chỉ số liên quan được chỉ ra ở bảng 33. Trong số 7 QTL, có 2 QTL nằm trên nhiễm sắc thể số 1, các QTL còn lại nằm trên nhiễm sắc thể số 3, 6, 8, 9 và 10. Chỉ có qDroughtDLR-8-DT có giá trị AE là dương, như vậy allel tăng thêm khả năng chịu hạn đến từ giống LC93-1, các QTL còn lại đều có giá trị âm và allel đến từ giống lúa Khang dân 18; như vậy mặc dù có khả năng chịu hạn kém hơn giống LC93-3 nhưng trong quần thể F2 có sự tương tác allel thì các allel đến từ giống Khang dân 18 đã làm tăng khả năng chịu hạn. qDroughtDLR-10-DT được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 9 có các chỉ số gồm: AE, LOD và Var. exp. lớn nhất tương ứng là: -0,058; 6,13 và 17,4; đây là QTL chính liên quan đến thời gian chịu hạn (DLR).

Bảng 33: Các QTL được phát hiện liên quan đến độ cuốn lá (LDS)

QTL	Chỉ thị SSR biên	Nhiễm sắc thể	AE ^a	LOD	Var. exp. (%) ^b
<i>qDroughtLDS-1-DT</i>	RM01201 - RM08148	1	0,008	3,36	10,1
<i>qDroughtLDS-3-DT</i>	RM03441 - RM05140	3	- 0,017	3,41	11,9
<i>qDroughtLDS-8-DT</i>	RM04955 - RM07013	8	0,030	3,59	11,0
<i>qDroughtLDS-9-DT</i>	RM01896 - RM05657	9	- 0,154	4,14	12,9
<i>qDroughtLDS-10-DT</i>	RM05352 - RM03123	10	- 0,087	4,35	12,7

^a Hiệu quả di truyền tăng thêm do sự tương tác giữa 2 allel của LC93-1 và Khang dân 18. AE có giá trị dương và giá trị âm có nghĩa là allel làm tăng khả năng chịu hạn đến từ giống CL93-1 và giống Khang dân 18.

^b Đóng góp của QTL lên khả năng chịu hạn

Phân tích xác định QTL với các chỉ số: Độ cuộn lá và thời gian lá cuộn hoàn toàn đã xác định được 12 QTL trên các nhiễm sắc thể số: 1, 3, 6, 8, 9 và 10. Chỉ có nhiễm sắc thể số 6 có một QTL về thời gian lá cuộn hoàn toàn, các nhiễm sắc thể: 3, 8, 9 và 10, mỗi nhiễm sắc thể có hai QTL: một liên quan đến độ cuộn lá và một liên quan đến ngày lá cuộn hoàn toàn. Nhiễm sắc thể số 1 có 3 QTL, Các cặp QTL về độ cuộn lá và thời gian lá cuộn hoàn toàn: qDroughtLDS-1-DT và qDroughtDLR-1-DT; qDroughtLDS-3-DT và qDroughtDLR-3-DT; qDroughtLDS-10-DT và qDroughtDLR-10-DT có cùng các chỉ thị biên là: RM01201 - RM08148; RM03441 - RM05140; RM05352 - RM03123, như vậy các cặp QTL này có thể cùng vị trí tác động lên khả năng chịu hạn về thời gian cuộn lá hoàn toàn và độ cuộn lá. Hai QTL nằm trên nhiễm sắc thể số 9 là: qDroughtLDS-9-DT (độ cuộn lá) và qDroughtDLR-9-

DT (thời gian cuộn lá) có các chỉ số LOD và Var. exp. lớn nhất và là hai QTL chính; như vậy trong những bước tiếp theo, đặc biệt là bước làm "fine mapping" cần tập trung vào nhiễm sắc thể số 9 để phân tích hai QTL nói trên và tìm chỉ thị liên kết chặt với các QTL sử dụng trong chọn tạo giống lúa chịu hạn.

Bảng 34: Các QTL được phát hiện liên quan ngày cuộn lá hoàn toàn (DLR)

QTL	Chỉ thị SSR biên	Nhiễm sắc thể	AE ^a	LOD	Var. exp. (%) ^b
<i>qDroughtDLR-1-DT</i>	RM01201 - RM08148	1	- 0,005	3,53	10,7
<i>qDroughtDLR-1-DT</i>	RM03642 - RM03304	1	- 0,004	3,41	10,3
<i>qDroughtDLR-3-DT</i>	RM03441 - RM05140	3	- 0,015	4,25	15,5
<i>qDroughtDLR-6-DT</i>	RM06782 - RM06926	6	- 0,045	4,01	12,5
<i>qDroughtDLR-8-DT</i>	RM01789 - RM04955	8	0,009	3,45	10,4
<i>qDroughtDLR-9-DT</i>	RM04692 - RM06460	9	- 0,058	6,13	17,4
<i>qDroughtDLR-10-DT</i>	RM05352 - RM03123	10	- 0,032	5,08	15,7

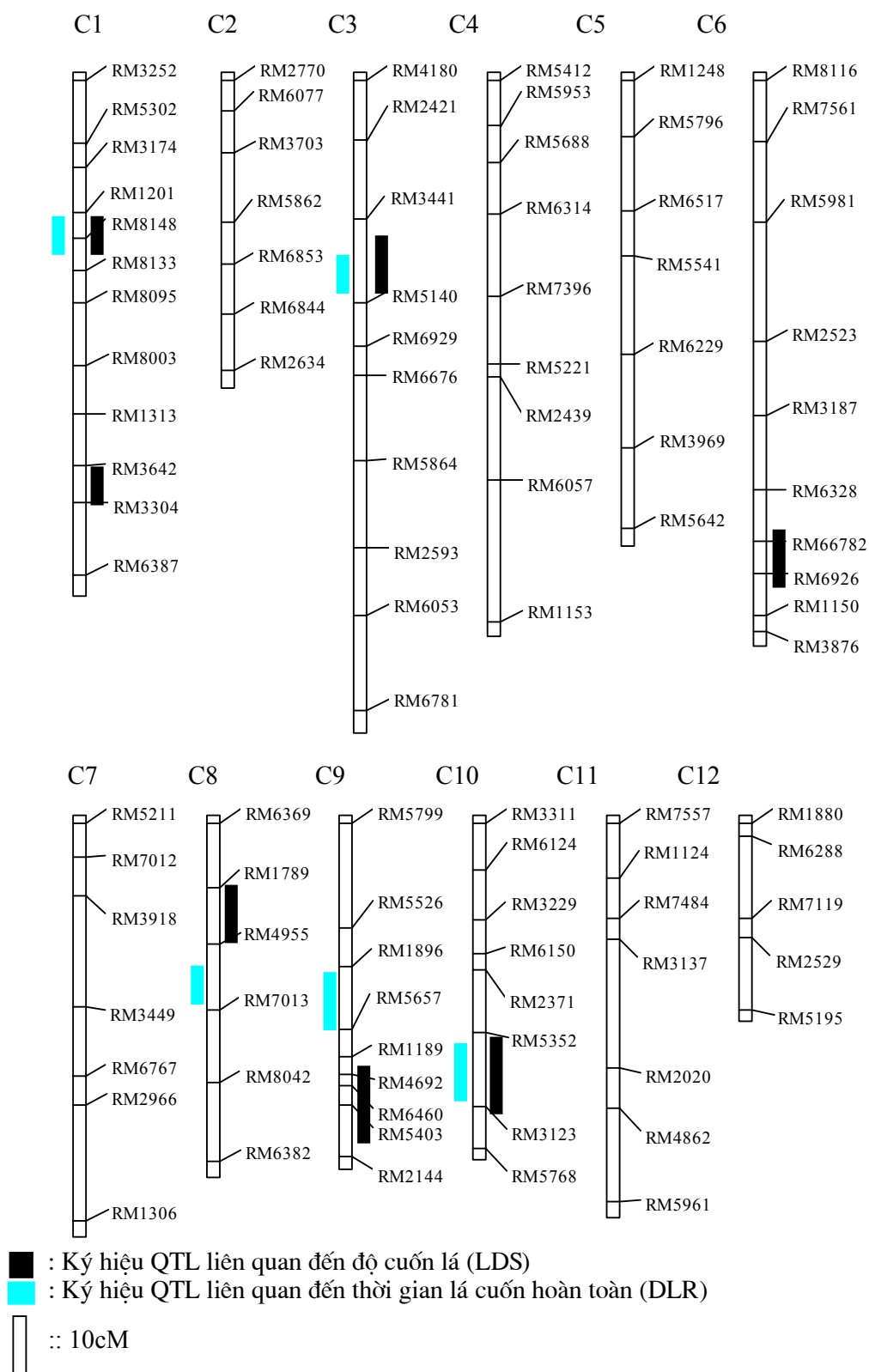
^a Hiệu quả di truyền tăng thêm do sự tương tác giữa 2 allen của LC93-1 và Khang dân 18. AE có giá trị dương và giá trị âm có nghĩa là allen làm tăng khả năng chịu hạn đến từ giống CL93-1 và giống Khang dân 18.

^b Đóng góp của QTL lên khả năng chịu hạn

qDroughtLDS-1-DT có nghĩa là QTL liên quan đến chịu hạn, nằm trên nhiễm sắc thể số 1; q: là QTL, Drought là hạn, LDS: là độ cuộn lá, 1: là nhiễm sắc thể số 1 và DT là viết tắt của "di truyền".

Qua phân tích khả năng chịu hạn với hai chỉ số độ cuộn lá và thời gian lá cuộn hoàn toàn, phân tích kiểu gen của các giống lúa LC93-1, Khang dân 18 và thế hệ F2 của chúng, kết hợp với phân tích liên kết sử dụng chương trình MAPMAKER/EXP ver 3.0 và MAPMAKER/QTL 1.1 xây dựng được bản đồ liên kết các chỉ thị SSR và xác định được các QTL liên quan đến khả năng chịu hạn như sau:

1. Xây dựng được bản đồ liên kết gồm 97 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể lúa với tổng chiều dài là 993,2cM và khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 10,24cM.
2. Đã xác định được 12 QTL liên quan đến chịu hạn trong đó:
 - 5 QTL liên quan đến độ cuộn lá sau khi tạo khô hạn gồm: qDroughtLDS-1-DT, qDroughtLDS-3-DT, qDroughtLDS-8-DT, qDroughtLDS-9-DT, qDroughtLDS-10-DT. Các QTL này nằm trên nhiễm sắc thể số: 1, 3, 8, 9, 10 và có chỉ thị phân tử SSR biên (chỉ thị liên kết gần nhất) là RM01201 - RM08148, RM03441 - RM05140, RM04955-RM07013, RM01896 - RM05657, RM05352 - RM03123.
 - 7 QTL liên quan đến thời gian cuộn lá hoàn toàn sau khi bị khô hạn gồm: qDroughtDLR-1-DT, qDroughtDLR-1-DT, qDroughtDLR-3-DT, qDroughtDLR-6-DT, qDroughtDLR-8-DT, qDroughtDLR-9-DT và qDroughtDLR-10-DT. Các QTL này nằm trên nhiễm sắc thể số 1, 3, 6, 8, 9, 10. Và có các chỉ thị SSR biên (chỉ thị gần nhất) là RM01201 - RM08148, RM03642 - RM03304, RM03441 - RM05140, RM06782 - RM06926, RM01789 - RM04955, RM04692 - RM06460, RM05352 - RM03123.
3. Các cặp QTL về độ cuộn lá và thời gian lá cuộn hoàn toàn: qDroughtLDS-1-DT và qDroughtDLR-1-DT; qDroughtLDS-3-DT và qDroughtDLR-3-DT; qDroughtLDS-10-DT và qDroughtDLR-10-DT có cùng các chỉ thị biên là: RM01201 - RM08148; RM03441 - RM05140; RM05352 - RM03123, như vậy các cặp QTL này có thể cùng vị trí tác động lên khả năng chịu hạn về độ cuộn lá, thời gian cuộn lá hoàn toàn và có thể là các QTL đa allel.
4. 2 QTL: qDroughtLDS-9-DT (về độ cuộn lá) và qDroughtDLR-9-DT (thời gian lá cuộn hoàn toàn) đều nằm trên nhiễm sắc thể số 9 có chỉ số LOD và phần trăm đóng góp tới kiểu hình cao nhất trong số các QTL được xác định, chúng là các QTL chính tác động lên khả năng chịu hạn của lúa.



Hình 64: Bản đồ liên kết giữa các chỉ thị SSR và 12 QTL đã được phát hiện liên quan đến khả năng chịu hạn

CHƯƠNG 4: TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

Từ những nỗ lực, sáng tạo của chủ nhiệm đề tài và các thành viên tham gia Đề tài/Dự án, sau một thời gian nghiên cứu chúng tôi đã thu được một số kết quả sau:

1. Đề tài đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu truyền thống và hiện đại như: phương pháp lai truyền thống, đánh giá kiểu hình, các phương pháp sinh học phân tử và kỹ thuật gen; sử dụng công nghệ thông tin để xây dựng, thiết kế phần mềm và cập nhật thông tin, quản trị cơ sở dữ liệu. Tất cả các phương pháp nghiên cứu này đã được áp dụng rộng rãi trong và ngoài nước, chúng tôi đã có một số cải tiến và tất cả những cải tiến đều đem lại những kết quả tin cậy và có độ chính xác cao.
2. Đề tài đã đạt được các kết quả về công nghệ thông tin và kết quả về nghiên cứu ứng dụng. Đã đưa ra được phần mềm cơ sở dữ liệu sinh học và Website về sinh vật biến đổi gen. Đây là cơ sở dữ liệu tổng quát nhất và có đầy đủ thông tin liên quan đến sinh vật biến đổi gen, cập nhật nhiều thông tin của nhiều Website như isaaa, agbios, agbiotech, aphis, ...và của các viện nghiên cứu, các trường đại học trong nước và quốc tế.
3. Kết quả về đào tạo: Đã đào tạo và hướng dẫn được 1 cử nhân công nghệ sinh học, đã bảo vệ xuất sắc vào năm 2005. Thông qua đề tài, chúng tôi đã đào tạo được đội ngũ cán bộ nghiên cứu thành thạo về truy cập hệ thống Website, nâng cao trình độ ngoại ngữ và có kỹ năng trong nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, kỹ thuật di truyền.
4. Đề tài đã thu được toàn bộ các kết quả cần thiết theo Thuyết minh ban đầu, với kết quả chính xác và có độ tin cậy. Đó là: Đã có được phần mềm quản lý cơ sở dữ liệu mở để cập nhật thông tin, tìm kiếm và truy cập về GMOs; Đã xây dựng được Website chứa đựng dữ liệu sinh học về cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen; Ngoài ra, chúng tôi đã tìm được 3 phương pháp xác định GMOs chuẩn xác, nhanh nhạy và có độ chính xác cao; Đã lập được 2 bản đồ chỉ thị

phân tử của gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dực chiêm và gen chịu hạn ở lúa LC93-1.

5. Để trang Web hoàn thiện hơn nữa, đề tài cần cập nhật thông tin và nghiên cứu nhiều hơn về vấn đề đánh giá rủi ro đối với sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng. Từ đó nâng cao vấn đề quản lý an toàn sinh học đối với các sản phẩm khoa học này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

I. KẾT LUẬN

Đề tài KC.04.34 đã hoàn thành đúng tiến độ đề ra như trong Thuyết minh ban đầu, cụ thể là đã đạt được những kết quả sau:

1. Xây dựng được phần mềm quản lý cơ sở dữ liệu mở để cập nhật thông tin liên quan đến sinh vật biến đổi gen. Thiết kế, xây dựng Website chứa đựng các cơ sở dữ liệu về cây trồng, vật nuôi, vi sinh vật biến đổi gen và sản phẩm dẫn xuất của chúng (<http://www.gmo.gov.vn>).
2. Đã tối ưu hoá được 3 phương pháp để nhận biết cây trồng biến đổi gen và sản phẩm của chúng:
 - Xây dựng được quy trình phản ứng PCR để xác định đoạn *CaMV 35S*, *T-NOS*, gen *Bt*, *PAT*. Phát hiện ra một số mẫu thức ăn gia súc đang tiêu thụ trên thị trường Việt Nam có chứa sản phẩm biến đổi gen. Sử dụng Real-time PCR để định lượng GMOs có trong hỗn hợp hạt ngô chuyển gen và không chuyển gen (0,1 %, 1% hạt ngô chuyển gen) và hỗn hợp đậu tương chuyển gen và không chuyển gen (0,5% và 100% hạt đậu tương Roundup Ready). Phương pháp PCR có độ chính xác khá cao, có thể định tính và định lượng được GMOs. Tuy nhiên, đây là phương pháp không kinh tế, yêu cầu thiết bị hiện đại, kỹ thuật viên có tay nghề cao.
 - Sử dụng que thử ELISA nhận biết gen *CryIA(c)* có trong ngô Bt và gen *EPSPS* có trong đậu tương Roundup Ready. Đây là phương pháp nhanh, nhạy, rẻ, thích hợp với việc sàng lọc ban đầu. Tuy nhiên nó chỉ đặc hiệu với một số ít đối tượng như *CryIA(b)/CryIA(c)*, *CP4-EPSPS*.
 - Tìm ra được quy trình để xác định được gen *CryIA(c)* có trong giống ngô chuyển gen nhờ kỹ thuật lai phân tử ADN. Đây là phương pháp có độ chính xác cao hơn 2 phương pháp trên. Nhưng thời gian phân tích dài, phức tạp, chi phí cao, chỉ kiểm tra được định tính các thành phần GMOs.
 - Xác định được các cặp môi, mẫu dò và bộ kit để phát hiện các gen được chuyển vào cây trồng như gen kháng thuốc trừ cỏ *PAT*, *EPSPS*, gen kháng sâu *CryIA(b)*, *CryIA(c)*.
3. Đề xuất 2 giải pháp để quản lý, đánh giá một số cây trồng biến đổi gen (ngô, lúa, bông, đậu tương) có triển vọng và các sản phẩm thức ăn chăn nuôi được

chế biến từ ngô, đậu tương biến đổi gen. Đó là giải pháp đánh giá dựa vào cấu trúc phân tử và dựa vào đặc điểm hình thái. Cũng như cảnh báo một số gen chuyển có tiềm ẩn rủi ro cho môi trường, con người và cân bằng sinh thái.

4. Đã xây dựng được bản đồ chỉ thị phân tử của các gen kháng bệnh đạo ôn và gen chịu hạn ở lúa sử dụng phần mềm MAPMAKER/EXP ver 3.0 và MAPMAKER/QTL ver.1.1:
 - Gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa Dự Chiêm: xây dựng được bản đồ liên kết gồm 116 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể lúa với tổng chiều dài là 749,1cM và khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 6,46cM.
 - Gen chịu hạn ở lúa LC93-1: xây dựng được bản đồ liên kết gồm 97 chỉ thị phân tử SSR phân bố trên 12 nhiễm sắc thể lúa với tổng chiều dài là 993,2cM và khoảng cách trung bình giữa các chỉ thị là 10,24cM.

II. KIẾN NGHỊ

Để giúp cho trang Web và phần mềm quản lý được đầy đủ và hoàn thiện hơn nữa, chúng tôi xin trân trọng đề nghị Bộ Khoa học và Công nghệ, Ban Chủ nhiệm Chương trình KC.04 xem xét, tạo điều kiện cho Viện Di truyền Nông nghiệp cũng như Chủ nhiệm đề tài và nhóm cán bộ nghiên cứu của đề tài KC.04-34 được tiếp tục thực hiện tiếp Đề tài/Dự án: “*Nghiên cứu hoàn thiện phần mềm và cơ sở dữ liệu để quản lý an toàn sinh học sinh vật biến đổi gen tại Việt Nam*”, giúp hoàn thiện phần quản lý an toàn và đánh giá rủi ro đối với sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng. Bao gồm:

- Bổ sung nội dung của trang website về: vấn đề dán nhãn và các luật định về GMOs ở các quốc gia khác nhau; Bổ sung thêm thông tin về GMOs hiện có tại Việt Nam,...
- Quản lý và đổi mới thường xuyên trang website.
- Cập nhật cơ sở dữ liệu và hoàn thiện phần mềm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tiếng Việt

1. Nguyễn Văn Cường, Vũ Văn Diễn, Nguyễn Kim Độ, Nguyễn Thị Diệu Thuý, Quyền Đình Thi, Trần Quốc Dung (1999), “*Tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng người*”, Báo cáo KH, Hội nghị CNSH toàn quốc, HN 1999- tr 1347.
2. Nguyễn Đức Doanh. (1998), "Tổng quan về cây chuyển gen từ năm 1986-1997". Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây lúa. Huế, tr. 72-73.
3. Nguyễn Đức Doanh, Nguyễn Văn Mùi, Đặng Trọng Lương (2001), “*Những kết quả ban đầu về chuyển gen vào cây cải dầu*”, Tạp chí thông tin công nghệ sinh học ứng dụng, số 1/2001- tr55.
4. Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hổ, Nguyễn Văn Uyển (2003), “*Tạo cây Hông (Paulownia fortune) chuyển gen kháng sâu thông qua vi khuẩn Agrobacterium Tumefaciens*”, Báo cáo Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội , tr1088 – 1090.
5. Nguyễn Thiết Giáp (2006), “*Công nghệ sinh học phục vụ nông nghiệp*”, http://www.nacentech.ac.vn/NACENTECH/Display_news.asp?id=346
6. Lê Huy Hàm, Huỳnh Thị Mai, (2003), “*Cây trồng biến đổi gen tình hình nghiên cứu ứng dụng và các quan điểm phát triển*”, Tổng luận Khoa học Công nghệ, số 4.
7. Trần Thị Cúc Hoà, Lê Trần Bình, Bùi Bá Bổng (2003), “*Tiêu chuẩn hoá hệ thống chọn lọc mannose và ứng dụng hệ thống này trong chuyển nạp gen hữu dụng bằng Agrobacterium ở lúa*”, Báo cáo Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, tr 761 – 765.
8. Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Tâm, Nguyễn Văn Uyển (2003), “*Một số nghiên cứu chuyển gen vào cây thuốc lá (Nicotiana tabacum L.) và cây ngô (Zeamays L.) bằng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens*”, Báo cáo Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, tr 1096 – 1101.
9. Trần Bích Lan, Nguyễn Lan Hoa, Nguyễn Đức Doanh và Trần Duy Quý. (1998), “*Kết quả bước đầu sử dụng Agrobacterium tumefaciens trong nghiên*

- cứu chuyển gen vào lúa*" Hội nghị Toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ Sinh học cây lúa, Huế, tr 85-86.
10. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu (2003), "*Bản đồ di truyền và bản đồ vật lý của gen kháng rầy nâu Bph-10*", Tạp chí Lúa Omon, số 11/2003, tr 35-41.
 11. Đặng Trọng Lương, R.Offringa, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng, Trần Duy Quý, W.Dolf, và Pau J.J.Hooykaas (1999), "*Thiết kế lại cấu trúc gen Bt (Bacillus thuringiensis) để chuyển vào cây hai lá mầm*". Báo cáo Khoa học Proceedings. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội 1999, Nhà xuất bản KHKT, Hà nội, tr. 1371-1376.
 12. Đặng Trọng Lương, Nguyễn Đức Doanh, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng và Trần Duy Quý, (2001), "*Nghiên cứu chuyển gen CryIac kháng sâu vào một số giống cải bắp (Brassica oleracea var Capitata) qua Agrobacterium*". Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000, Viện Di truyền Nông nghiệp, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà nội, tr.120-128
 13. Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Đức Thành, Lê Thị Muội (2000), "*Sự duy trì và biểu hiện ổn định của gen lục lạp ngoại lai trong cây thuốc lá Nicotiana Plumbaginifolia biến nạp qua các thế hệ R1, R2*", Tạp chí sinh học, số 4/T12/200, tr 26.
 14. Nguyễn Mười (*biên dịch*)(1998), "Công nghệ sinh học", NXB ĐH Quốc Gia, Hà Nội, 238tr.
 15. Lã Tuấn Nghĩa (1999), "Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của quần thể nấm đạo ôn và một số giống lúa phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh đạo ôn". *Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam*.
 16. Lã Tuấn Nghĩa, Nguyễn Bá Ngọc, Trần Duy Dương, Vũ Đức Quang (2002), "*Đánh giá tính kháng QTL bệnh đạo ôn ở lúa*", Kết quả nghiên cứu khoa học Viện Di truyền Nông nghiệp 1999-2000, tr37-39.
 17. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Trịnh Toàn, Nguyễn Thị Kim Dung, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (2001), "*Những kết quả bước đầu sử dụng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng đạo ôn trong công tác chọn giống lúa kháng bệnh*", Thông tin công nghệ ứng dụng, Số 2/2001.
 18. Phan Cự Nhân (2000), "Di truyền học động vật và ứng dụng", NXB Giáo Dục, 198 tr.

19. Nguyễn Văn Thiện (2001), “*Cơ thể và sản phẩm biến đổi gen*”, Tạp chí Chăn nuôi, số 8/2001, tr18.
20. Nguyễn Trịnh Toàn, Nguyễn Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Ninh Thuận, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý (2000), “*Tìm chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng đạo ôn ở các giống lúa địa phương Việt Nam*”. Kết quả nghiên cứu khoa học Viện Di truyền Nông nghiệp 2001, tr. 129-138.
21. Nguyễn Sỹ Trạm, “*Một số nhận biết về thực phẩm biến đổi gen*”, KHCN số tháng 1-2006, tr17.
22. Trung tâm Thông tin tư liệu khoa học và Công nghệ Quốc gia , “*Cây trồng biến đổi gen-Tình hình nghiên cứu ứng dụng và các quan điểm phát triển*”, số 4 / 2003.
23. Trung tâm Tri thức toàn cầu về Công nghệ Sinh học cây trồng (2003), “*Sản phẩm Công nghệ Sinh học thực phẩm (Hiện nay đang được bán trên thị trường)*”, Pocket K N₀.2.
24. Đỗ Năng Vịnh, Lê huy Hàm, Phạm Thị Lý Thu, U.Ryschka (2001), “*Chuyển gen trực tiếp vào tế bào trần ở B.olebacea L.Var.Botrytis thông qua PEG*”, Tạp chí NN & PTNT, số 11/ 2001, tr 792.
25. Viện Di Truyền Nông Nghiệp (2001), “*Kết quả nghiên cứu khoa học 1999-2000*”, NXB Nông Nghiệp HN, 250 tr.
26. Viện Sinh Học Nhiệt Đới (2001), “*CNSH và nông nghiệp sinh thái bền vững*”, NXB Nông Nghiệp TP.HCM, 195 tr.
27. <http://www.isaaa.org>, “*Tình trạng cây trồng CNSH/cây trồng chuyển gen được đưa vào canh tác với mục đích thương mại hoá trên thế giới trong năm 2005*”.
28. <http://www.sinhhocvietnam.com.vn>, “*Cây CG – 1 thập kỷ thua và thắng*”.

II. Tiếng Anh

29. Ahmed, F. E. (1995), "*Application of molecular biology to biomedicine and toxicology*", J. Environ. Sci. Health C11, p1-51.
30. Ahmed, F. E. (2000), "*Molecular markers for early cancer detection*", J. Environ. Sci. Health C18, p75–125.
31. Ahmed, F. E. (2002), "*Detection of genetically modified organisms in foods*", Trends in Biotech. 20, p215-223.
32. Andreas D. Baxevanis, B. F. Francis Ouellette (2001), "Bioinformatics - A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", *John Wiley & Sons Publisher, England*, 495p.
33. Anklam, F. E. (2002), "*Detection of genetically modified organism in foods*", Trends in Biotech. 20, p215-223.
34. Anonymous (1998), "*Council regulation (EC) No. 1139/98, concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms*", Official J. Eur. Communities: Legislation 159, p4–7.
35. Arne Holst-Jensen (2001), "*GMO detection methods and validation*", National Veterinary Institute, Section of Food & Feed Microbiology, Ullevaalsveien 68, P.O.Box 8156 Dep. 0033 Oslo, Norway.
36. Bailey JM and Whipps JM (1995), "*Risk assessment and the release of genetically modified microorganisms into the environment*", Department of the Environment, Transport and the Regions (DETR) Research Report no.7, p1-66.
37. Berdal KG, Holst-Jensen A. (2001), "Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses", *European Food Research and Technology*.
38. Betthausen J. (2000), "*Production of cloned pigs from in vitro systems*", October Nature 18, p1055–1059.
39. Brett, G. M. (1999), "*Design and development of immunoassays for detection of proteins*", Food Control 10, p401–406.
40. Brown FB (1957), "*Natural cross-pollination in rice in Malaya*", Malay Agric J 40, p264–267.

41. Charles F. Chilcutt & Bruce E. Tabashnik (2004), "*Gene flow from transgenic Bt Corn to non-Bt Corn refuges*", ISB News Report July 2004, p1-4.
42. Chen, L. H. (2002), "*GMO regulation in Taiwan. Proceedings International Workshop on Impacts and Biosafety of Genetically Modified Agricultural Products*", (Pan, T. M. ed) p61-68. FTC/ASPAC.
43. Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR. (2004), "*Gene flow from cultivated rice (Oryza sativa) to its weedy and wild relatives*", Annals of Botany 93, p67–73.
44. Cochet, O. (1998), "*Immunological Techniques Made Easy*", John Wiley.
45. Damak S et al. (1996), "*Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor I*", Biotechnology 14, p181-184.
46. David W Mount (2004), "*Bioinformatics – Sequence and genome analysis*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 692p.
47. Donegan K.K., Palm C.J., Fieland V.J., Porteous L.A., Ganio L.M., Schaller D.L., Bucio L.Q., Seidler R.J. (1995), "*Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the Bacillus thuringiensis var. kurstaki endotoxin*", Applied Soil Ecol. 2, p111-124.
48. Donegan K.K., Schaller D.L., Stone J.K., Ganio L.M., Reed G., Hamm P.B., and Seidler R.J. (1996), "*Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expression the Bacillus thuringiensis var. tenebrionis endotoxin*", Transgenic Res.5, p25-35.
49. Ellstrand NC. (2003), "*Dangerous Liaisons? When Cultivated Plants Mate with Their Wild Relatives*", Baltimore: Johns Hopkins University Press.
50. Fan J et al. (1999), "*Transgenic rabbit models for biomedical research: Current status, basic methods and future perspectives*", Pathology International 49, p583-594.
51. Fukuoka S and K. Okuno (2001), "*QTL analysis and mapping of pi21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice*", Theor Appl Genet (2001) 103, p185–190.
52. Gachet E, Martin GG, Vigneau F and Meyer G (1999), "*Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available*", Trends in Food Science & Technology 9, p380-388.

53. Gealy DR, Mitten DH, Rutger JN. (2003), "*Gene flow between red rice (Oryza sativa) and herbicide-resistant rice (O. sativa): Implications for weed management*", Weed Technology 17: 627–645.
54. GeneScan Europe (2001), "*GMO Chip: Test Kit for the Detection of GMOs in Food Products*", Cat. No. 5321300105, Bremen, Germany.
55. González, I., García, T., Fernández, A., Sanz, B., Hernández, P. E., Marín, R. (1999), "*Rapid enumeration of Escherichia coli in oysters by a quantitative PCR-ELISA*", J Appl Microbiol 66, p231–236.
56. Gudmundur H. Gudmundson, et al. (1991), "*The Cecropin Locus Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in Hyalophora cecropia*", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 18, Issue of June 25, p11510-11517.
57. Hagen, M. and Beneke, B. (2000), "*Detection of genetically modified soy (Roundup-Ready) in processed food products*", Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 113, p454–458.
58. Halford NG, Shewry PR (2000), "*Genetically modified crops: methodology benefits, regulation and public concerns*", Br Med Bull, 56/2000, p62-73.
59. Hammer RE et al. (1985), "*Production of transgenic rabbits, sheep, and pigs by microinjection*", Nature 315, p680.
60. Håvard Nesvold 1,2, Anja Bråthen Kristoffersen 1, Arne Holst-Jensen² and Knut G. Berdal 2,* (2005), "*Design of a DNA chip for detection of unknown genetically modified organisms (GMOs)*", Bioinformatics Vol.21, No9/2005, p1917-1926.
61. Heid, C. A. (1996), "*Real-time quantitative PCR*", Genome Res. 6, p986-994.
62. Hellebrand, M., Nagy, M., Murrseel, J. T. (1998), "*Determination of DNA traces in rapeseed oil*", Z Lebensm Unters Forsch A 206, p237–242.
63. Hertzberg, M. (2001), "*cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using cDNA target amplification protocols*", Plant J. 25, p585–592.
64. Y. Hikichi et al. (1998), "*Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects: Behavior of Bioluminescent Ralstonia solanacearum YN5 containing the luxCDABE in tomatoes susceptible and resistant to bacterial wilt*", p233-242.
65. Hill KG et al. (1992), "*Production of transgenic cattle by pronuclear injection*", Theriogenology 37, p222.

66. Hill, M. (1999), "*Identification of the aph IV gene from protoplasts-derived maize plants by a simple nonradioactive DNA hybridization method*", In Vitro Cell. Dev. Biol. 35. p154–156.
67. Hübner, P. (1999), "*Quantitation of genetically modified organisms in food*", Nat. Biotechnol. 17, p1137–1138.
68. Hugo R. Permingeat, Martin I. Geggiardo and Ruben H. Vallejos (2002). "*Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR*", J Agric. Food Chem 50, p4431-4436.
69. Hupfer C, Hotzel H, Sachse K and Engel KH (1998), "*Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction*", Z Lebensm Unters Forsch A 206, p203-207.
70. Hurst CD, Knight A and Bruce IJ (1999), "*PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs*", Mol. Breed.. 5, p579-586.
71. Hurburgh, C. R., Rippke, G. R., Heithoff, C., Roussel, S. A., Hardy, C. L. (2000), "*Detection of genetically modified grains by near-infrared spectroscopy*", Proceedings PITTCON 2000—Science for the 21st Century, #1431. New Orleans, La. 12–17 March 2000 or Internet 2000. <http://pittcon24857.omnibooksonline.com/>
72. Hsu-Yang Lin, Lih-Chiueh, Daniel Yang-Chih Shih (2000), "*Detection of genetically modified soybeans and maize by the Polymerase chain reaction method*", Journal of Food and Drug Analysis, 8(3), p200-207.
73. IRRI (1991), "*Report of the meeting to discuss coordination of rice RFLP mapping*", In: Rice Genetics II. P.O. Box 933, Manila, Philippines, p815.
74. ISO/TC34 WG7 N 26 (2001), "*Detection of genetically modified organisms and derived products. Qualitative nucleic acid based methods*", Anexes, p47-50.
75. James C. (2000), "*Global status of Commercialised Transgenic Crops: 2000*" ISAAA Briefs No 23. ISAAA, Ithaca, New York, 2001.
76. James Tisdall, (2001), "*Beginning Perl for Bioinformatics*", O'Reilly Publisher, USA, 384p.
77. Javed Akhter PhD, Mohammed Qutub PhD, Norman Burnham MBA, Mohammed Akhtar MD.FCAP (2001), "*Genetically modified foods: health and safety issues*", Annals of Saudi Medicine, 21(3-4), p161-164.

78. Joana Falcao Salles¹; Patricia de Medeiros Gitahy; Leif Skot; Jose Ivo Baldani (2000), "*The use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cry3A gene from Bacillus thuringiensis*", Brazilian Journal of Microbiology. 31, p155-161.
79. Keatley KL (2000), "*Controversy over genetically modified organisms: the governing laws and regulations*", Qual Assur 2000 Jan-Mar, 8(1), p33-36.
80. Khush GS (1993), *Floral structure, pollination biology, breeding behaviour, transfer distance and isolation considerations*, World Bank Technical Paper, Biotechnology Series No 1, Rice Biosafety. The Rockefeller Foundation.
81. Landgraf. A., Reckmann, B., Pingoud, A. (1991), "*Determination of GMO in soybean*", Anal Biochem 198, p86–91.
82. Lavitrano M et al. (1989), "*Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice*", Cell 57, p717-723.
83. Lenski RE (1993), "*Evaluating the fate of genetically modified microorganisms in the environment: are they inherently less fit?*", Experientia. 49, p201-209.
84. Lih-Ching C, Yen-Ling C, Jei-Hwa Y and Yang-Chih Shih D. (2001), "*Detection of four types of genetically modified maiza by polymerase chain reaction and immuno-kit methods*", Journal of Food and Drug Analysis. 9, p50-57.
85. Li-Huang ZHU¹, Ying CHEN¹, Yuu-Bin XU², Ji-Chen XU¹, Hong-Wei CAI³ and Zhong-Zhuan LING⁴ (1993), "*Construction of a molecular map of rice and gene mapping using a double haploid population of a cross between Indica and Japonica varieties*", Rice Genetics Newsletter, Vol. 10/1993, p132-135.
86. Lipp, M. (1999), "*IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder*", J. AOAC Int. 82, p923–928.
87. Lipton, C. R. (2000), "*Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients*", Food Agric. Immunol. 12, p153–164.
88. Lord L (1935), "*The cultivation of rice in Ceylon*", J Exp Agric 3, p119–128.
89. Matsuoka, T., H. Kuribara, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isshiki, M. Toyoda & A. Hino (2001), "*A multiplex PCR method of detecting*

- recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize*", J. Food Hyg. Soc. Japan 42, p24-32.
90. Marta Herna'ndez, Adolfo Ri' o, Teresa Esteve, Salome' Prat, and Maria Pla* (2001), "*A Rapeseed-Specific Gene, Acetyl-CoA Carboxylase, Can Be Used as a Reference for Qualitative and Real-Time Quantitative PCR Detection of Transgenes from Mixed Food Samples*", J. Agric. Food Chem.49, p3622-3627.
 91. McCouch, S.R., G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman and S.D. Tanksley (1988), "*Molecular mapping of rice chromosomes*", Theor. Appl. Genet. 76, p815-829.
 92. McCouch SR, RJ Nelson, J Tohme and RS Zeigler (1994), "*Mapping of blast resistance genes in rice*". In:Rice blast disease of R. Zeigler, S. A. Leong and P. S. Teng, CAB Int., Wallingford, UK, p167-187.
 93. McPherson, M. J. and Møller, S. G. (2000), *PCR*, Springer-Verlag.
 94. Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfa V, Catala MM, Baldi G, Mele E. (2001), "*Field assessment of gene flow from transgenic to cultivated rices (Oryza sativa L.) using a herbicide resistance genes as tracer marker*", Theoretical and Applied Genetics 103: 1151–1159.
 95. Messeguer J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E, Mele E. (2004), "*A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed*", Molecular Breeding 13: 103–112.
 96. Michael R. Barnes and Ian C. Gray (2003), "*Bioinformatics for genomics*", John Wiley & Sons Publisher, England, 408p.
 97. Muhammad Asif (2004), "*GMO Detection methods*", NIBGE-FAO workshop on GMODetection.
 98. Muller M and Brem G. (1998), "*Transgenic approaches to the increase of disease resistance in farm animals*", Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties 17, p365-378.
 99. Murray JD et al (eds) (1999), "*The future of transgenic farm animals. In: Transgenic Animals in Agriculture*", CABI International, p269-282.
 100. Murray JD and Anderson GB. (2000), "*Genetic engineering and cloning may improve milk, livestock production*", California Agriculture 54, p57-65.
 101. Nielsen, K.M., F. Gebhard, K. Smalla, A.M. Bones, J.D. Van Elsaas (1997c), "*Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the*

- soil bacterium Acinetobacter calcoaceticus BD413*", Theor. Appl. Genet. 95, p815-821.
102. Official Collection of Test Methods. (1997), "*Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe*", German Federal Foodstuffs Act – Food Analysis, article 35, L 24.01–1. Beuth, Berlin Köln.
 103. Official Collection of Test Methods (1998), "*Detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe*", German Federal Foodstuffs Act–Food Analysis, article 35, L 23.01.22–1. Beuth, Berlin Köln.
 104. Oka HI, Chang WT (1961), "*Hybrid swarm between wild and cultivated rice species *Oryza perennis* and *O. sativa**", *Evolution* 15, p418–430.
 105. Pursel VG et al. (1989), "*Genetic engineering of livestock*", *Science* 244, p1288-1289.
 106. Palmiter RE et al. (1982), "*Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein- growth hormone fusion genes*", *J. Nature* 300, p611-615.
 107. Pauli, U., Liniger, M., Zimmermann, A. (1998), "*Detection of DNA in soybean oil*", *Z Lebensm Unters Forsch* 207, p264–267.
 108. Phundan Singh (2001), "*Genetics Today*", Kalyani Publishers, 88p.
 109. Pinkert CA and Murray JD. (1999), "*Transgenic Farm Animals. In Transgenic Animals in Agriculture*", Murray JD et al (eds), CABI International, p1 -18.
 110. Onishi A et al. (2000), "*Pig Cloning by Microinjection of Fetal Fibroblast Nuclei*", *Science* 289, p1188-1190.
 111. Pursel et al. (1992), "*Transfer of cSKI gene into swine to enhance muscle developmen*", *Theriogenology* 37, p278.
 112. Ravinder Sardana, Stefan Dukjandjiev, Marc Giband, Xiongying Cheng, Kyra Cowan, Connie Sauder, and Illimar Altosaar. (1996), "*Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b&c) by expression in maize endosperm culture*", *Plant Cell Rep.* 15, p677-681.

113. Rogan, G. J. (1999), "*Immunodiagnostic methods for selection of 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase in Roundup Readyd soybeans*", Food Control 10, p407–414.
114. Rissler, J. and M. Mellon. (1993), "Perils amidst the promise: ecological risks of transgenic crops in a global market", Union of Concerned Scientists. Cambridge, MA.
115. Sallaud C, M. Lorieux, E. Roumen, D. Tharreau, R. Berruyer, O.Garsmeur, P. Svestasrani, A. Ghesquiere , J.-L. Notteghem (2003), "*Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy*", Theor Appl Genet 106:794-803.
116. Sambrook, J. and Russel, D. (2000), "Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edn)", Cold Spring Harbor Laboratory Press.
117. Schreiber, G.A. (1999), "*Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods*", Food Control 10, p351–352.
118. Shirai N, Momma K, Ozawa S, Hashimoto W, Kito M, Utsumi S and Murata K (1998), "*Safety assessment of genetically engineered food: Detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans*", Biosci. Biotech. Biochem. 62, p1461-1464.
119. Simm G. (2000), "*Genetic improvement of cattle and sheep*". Farming Press, Tonbridge UK 2000. Chapter 6, Dairy Cattle Breeding.
120. Soda S, Uesugi K, Ike M and Fujita M (1999), "*Application of a floc-forming genetically engineered microorganism to a sequencing batch reactor for phenolic wastewater treatment*", Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(1), p85-91.
121. Stave, J. W. (1999), "*Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs*", Food Control 10, p367–374.
122. Srinivasan V, Subramanian A (1961), "*A note on natural cross-pollination in rice at the Agroculural Research Station, duthurai (Thanjavur District)*", Madras Agric J 48, p292–293.
123. Stewart CN, Halfhill MD, Warwick SI. (2003), "*Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives*", Nature Reviews Genetics 4, p 806–817.

124. Tabien R.E. , Z. Li, A.H. Paterson, M.A. Marchetti, J.W. Stansel, S.R.M. Pinson (2000), “*Mapping of four major rice blast resistance genes from ‘Lemont’ and ‘Teqing’ and evaluation of their combinatorial effect for field resistance*”, Theor Appl Genet 101, p1215–1225.
125. Tabien R.E., Z. Li, A.H. Paterson, M.A. Marchetti, J.W. Stansel, S.R.M. Pinson (2002), “*Mapping QTLs for field resistance to the rice blast pathogen and evaluating their individual and combined utility in improved varieties*”, Theor Appl Genet 105, p313–324.
126. Tanksley, S.D., N. Ahn, M. Causse, W.R. Coffman, T. Fulton, S.R. McCouch, G. Second, T. Tai, Z.Y. Wang, K.S. Wu and Z.H. Yu (1991), “*RFLP mapping of the rice genome*”). In: Rice Genetics II. IRRI, P.O. Box 933, Manila, Philippines, p435-442.
127. Taoufik, Y., Froger, D., Benoliel, S., Wallon, C., Dussaix, E., Delfraissy, J. F., Lantz, O. (1998), “*Quantitative ELISA-polymerase chain reaction at saturation using homologous internal DNA standards and chemiluminescence revelation*”, Eur Cytokine Netw 9, p197–204.
128. Taverniers I, Windels P, Van Bockstaele E, De Loose M. (2001), “*Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products*”, European Food Research and Technology, 213, p417-424.
129. Terry C and Harris N. (2001), “*Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries*”, European Food Research and Technology. 213, p425-431.
130. Tozzini, A.C., Martinez, C.M., Asurmendi, S. López, M.V. & Hopp H.E (2000), “*Analytical method for detection and quantification of living modified organisms (LMOs) in grains based on PCR*”, Submitted to Bio-techniques.
131. Trapmann S, Le Guern L, Kramer GN, Schimmel H, Pauwels J, Anklam E, Van den Eede G, Brodmann P. (2000), “*The certification of a new set of reference materials of soya powder with different mass fractions of Roundup ReadyTM soya*”, EUR...EN B-2440 GEEL, March 2000. <http://www.irmm-jrc.be>
132. Trapmann S, Le Guern L, Prokisch P, Robouch P, Kramer GN, Schimmel H, Pauwels J, Querci M, Van den Eede G and E. Anklam. (2001), “*The Certification of Reference Materials of Dry Mixed Maize Powder with different*

- Mass Fractions of MON 810 Maize”, Certified Reference Materials IRMM-413. <http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-413.pdf>
133. Trigalet A, et al. (1998), “*Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects: Elements of biocontrol of tomato bacterial wilt*”, p332-336.
 134. Tzu-Ming Pan (2002), “*Current status and detection of genetically modified organism*”, Journal of Food and Drug Analysis, Vol.10, No.4/2002, p229-241.
 135. Vaitilingom, M. (1999), “*Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods*”, J. Agric. Food Chem. 47, p5261–5266.
 136. Vaitilingom .M.H. pijnenburg, F. Gendre & P. Brignon (2000), “*Real – time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods*”, J. Agric.Food Chem, 47, p5261-5266.
 137. Vaughan A. Hilder, Donald Boulter (1999), “*Genetic engineering of crop plants for insect resistance-a critical review*”, Crop Protection, Volume 18, Number 3, p177 - 191.
 138. Wall RJ. (1996), “*Transgenic livestock: progress and prospects for the future*”, Theriogenology 45, p57-68.
 139. Wang, Guoliang (1992), “*RFLP mapping of major and minor genes for blast resistance in a durably resistance rice cultivar*”, PhD dissertation. IRRI, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
 140. Ward K.A. and Brown B.W. (1998), “*The production of transgenic domestic livestock: successes, failures and the need for nuclear transfer*”, Reproduction, Fertility and Development 10, p659-665.
 141. Ward TE, Bulmer D and Walton MR (1998), “*Development of genetically engineered bacteria for trichloroethylene degradation*”, Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 33(2), p179-193.
 142. Windels P, Taverniers I, Depicker A, Van Bockstaele E, De Loose M. (2001), “*Characterisation of the Roundup Ready soybean insert*”, European Food Research and Technology 213(2), p107-112.
 143. Wolf E et al. (2000), “*Transgenic technology in farm animals - progress and perspectives*”, Experimental Physiology 85, p615-625.

144. Wright G et al. (1991), "*High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep*", *Biotechnology* 9, p830-834.
145. WS Atkins Environment, Final Report (2002), "Genetically Modified Organisms for the Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants: The use of microorganisms for the bioremediation of pollutants".
146. Yates, K., ed. (1999), *Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms*, ILSI Europe.
147. K. Zenbayashi, T. Ashizawa, T. Tani, S. Koizumi (2002), "*Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32*", *Theor Appl Genet* 104, p547–552.
148. Zheng K.-L., R.-Y. Chai, M.-Z. Jin, J.-L. Wu, Y.-Y. Fan, H. Leung and J.-Y. Zhuang (2000), "*Mapping of leaf and neck blast resistance genes with RFLP, RAPD and resistance gene analogue in rice. Advances in Rice Blast Research*", Tharreau et al. eds., Kluwer Academic Publishers, p28-33.
149. Zhuang J.-Y., R.-Y. Chai, W.-B. Ma, J. Lu, M.-Z. Jin and K.-L. Zheng (1997), "*Genetic analysis of the blast resistance at vegetative and reproductive stages in rice*", *RGN* 14, p62-64.
150. Zimmermann. A, M.Liniger, J.Luthy, J.Pauli (1998), "*A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system*", *Lebensm-Wiss. u.Technol*, 31, p664-667.

PHỤ LỤC A: QUY TRÌNH NHẬN BIẾT GMOs

1. Quy trình tách ADN

❖ *Quy trình tách chiết ADN của các giống cây trồng chuyển gen dựa theo phương pháp của Hugo & CS (1995) có cải tiến.*

Quy trình tách chiết được tiến hành như sau:

- Cắt 1g lá non vào trong ống eppendoff 1,5 ml, bổ sung 200 µl đệm chiết và nghiền. Bổ sung tiếp 200µl đệm chiết và nghiền.
- Cho 400 µl phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1), lắc ngược ống và ly tâm trong 10 phút ở 12.000 vòng/phút.
- Chuyển lớp trên cùng sang ống eppendoff mới và bổ sung 1 thể tích (v/v) dung dịch phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24 : 1), lắc ngược ống rồi ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Chuyển lớp trên cùng sang ống eppendoff mới và bổ sung 1 thể tích Ethanol 100% (v/v), ly tâm 12.000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN.
- Rửa tủa ADN bằng Ethanol 75%, sau đó hong khô tủa trong máy cô chân không hoặc để khô tự nhiên.
- Hoà tan tủa ADN trong 50 µl đệm TE hoặc trong nước cất khử trùng đã loại ion, được ADN stock.

❖ *Quy trình tách chiết ADN của các sản phẩm thức ăn gia súc dựa theo Article of the Germany Federal Food Act, Method 24.01.1.*

Quy trình tách chiết bao gồm các bước sau:

- Nghiền mẫu trong cối xay và cân 200 mg vào ống ependoff 2 ml, bổ sung 1400 µl đệm chiết I vào và lắc trộn đều.
- Cho vào máy lắc cách thuỷ ở 60°C trong khoảng 30' ÷ 60', rồi lấy ra lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Lấy ra khoảng 750 µl dịch trên cùng cho vào ống ependoff 2 ml mới và bổ sung 750 µl hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) vào, lắc ngược ống. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

- Lấy ra 650 µl dịch (pha trên cùng) cho vào ống ependoff 2 ml. Bổ sung 1400 µl đệm chiết II và để ở nhiệt độ phòng trong 40 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN, hong khô.
 - Cho vào tủa ADN khoảng 750 µl đệm muối, để trong tủ lắc cách thủy ở 45°C cho đến khi tủa ADN tan.
 - Cho 750 µl hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), lắc nhẹ ngược ống và ly tâm 14.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút.
 - Lấy ra 650 µl dịch trên cùng cho vào ependoff 1,5 ml và bổ sung 650 µl Isopropanol, đặt ở nhiệt độ phòng trong 10 phút (hoặc để qua đêm ở 4°C).
 - Ly tâm 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút, loại bỏ dịch và giữ lại kết tủa ADN.
 - Rửa tủa ADN bằng Ethanol 70% (400µl) , sục tủa ADN lên và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ Ethanol 70%, rửa tiếp bằng 150µl Ethanol 100% và dùng pipet để loại bỏ Ethanol, rồi hong khô tủa ADN.
 - Hoà tan tủa ADN trong 50µl nước cất khử trùng đã loại ion, được ADN stock.
- Sau khi tách chiết xong, kiểm tra nồng độ ADN tổng số nhờ phương pháp điện di trên gel agarose 1% với so sánh là Lambda ADN.

2. Quy trình PCR

PCR thông thường:

Các phản ứng PCR được thực hiện trong thiết bị Eppendorf Mastercycler gradient (96 giếng), với thể tích cuối cùng là 25µl / phản ứng.

+ Hỗn hợp phản ứng:

Đệm PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,04 mM
Mồi xuôi và mồi ngược	0,6 µM (cho mỗi mồi)
	1,2 µM (đối với mồi CDPK Cry 03/ CDPK Cry 04 và PA 01/CM 01)
Taq polymerase	1U
ADN	50 ng
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

+ Điều kiện khuếch đại:

- *Cặp môi 35S1/35S2:*

- Chu kỳ 1: 94°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
58°C trong 30 giây
72°C trong 30 giây
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72°C trong 6 phút

- *Cặp môi NOS^F/ NOS^R :*

- Chu kỳ 1: 94°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
60°C trong 30 giây
72°C trong 30 giây
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72°C trong 7 phút

- *Cặp môi CDPK-cry03/CDPK-cry04:*

- Chu kỳ 1: 94°C trong 30 giây
 - Chu kỳ 2: 94°C trong 1 phút
63°C trong 30 giây
72°C trong 40 giây
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72°C trong 5 phút

- *Cặp môi HS01/Cry-CR01; PA01/CM01 và PA01/CM03:*

- Chu kỳ 1: 95°C trong 5 phút
 - Chu kỳ 2: 95°C trong 20 giây
60°C trong 40 giây
72°C trong 1 phút
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72°C trong 5 phút

♦ RT-PCR:

+ Các phân tích real time PCR được thực hiện trong thiết bị Perkin Elmer AB5700 SDS sử dụng hệ thống TaqMan, với thể tích cuối cùng là 25µl / phản ứng.

+ Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

Đệm PCR	1X (Quiagen hoặc Invitrogen)
MgCl ₂	4,5mM
dNTPs	200µM (bao gồm dUTP thay thế cho dTTP)

Môi xuôi và môi ngược	300nM
AmpErase	0,3U (các hệ thống sinh học ứng dụng)
Taq polymerase	1,25U (Hot- Start Quiagen hoặc Platin từ Invitrogen)
Mẫu dò có huỳnh quang	250nM (IDT, USA)
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

Các mẫu dò được đánh dấu bằng chất nhuộm thông báo huỳnh quang 6-carboxyfluorescein (FAM) ở đầu 5' và thuốc nhuộm làm tắt huỳnh quang 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) ở đầu 3'.

+ Điều kiện để khuếch đại là:

- Chu kỳ 1: 50⁰C trong 2 phút
 - Chu kỳ 2: 95⁰C trong 10 phút
 - Chu kỳ 3: 95⁰C trong 15 giây
60⁰C trong 1 phút.
- } 45 chu kỳ lặp lại

Các kết quả được phân tích nhờ hệ thống xác định trình tự của hệ thống sinh học ứng dụng PE.

♦ Multiplex-PCR:

+ Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

Đệm PCR	1X
MgCl ₂	1,5mM (đối với gen cryIA(b) và phản ứng multiplex PCR gồm gen <i>EPSPS</i> và <i>NOS</i>)
	2mM (đối với gen <i>Pat</i> và phản ứng multiplex PCR gồm gen zein và <i>35S</i>)
	3mM (phản ứng multiplex PCR gồm gen <i>Bt</i> và <i>Pat</i>))
dNTP	0,2mM (đối với các phản ứng đơn)
	0,3mM (phản ứng multiplex PCR)
Môi	0,4μM (đối với các phản ứng đơn)
	0,25μM (đối với phản ứng multiplex PCR)
Taq polymerase	1,5U
ADN đích	100ng (mẫu ngô)

	50ng (mẫu đầu tương)
H ₂ O deion khử trùng	Vừa đủ thể tích cuối cùng

Kỹ thuật PCR thông thường được thực hiện trong chu trình nhiệt PTC-96 hoặc Sontec với thể tích cuối cùng là 25μl / phản ứng.

Các hoá chất trong phản ứng ở tất cả các trường hợp đều là của hãng Promega, ngoại trừ trường hợp các oligo là của công ty Biosynthesis.

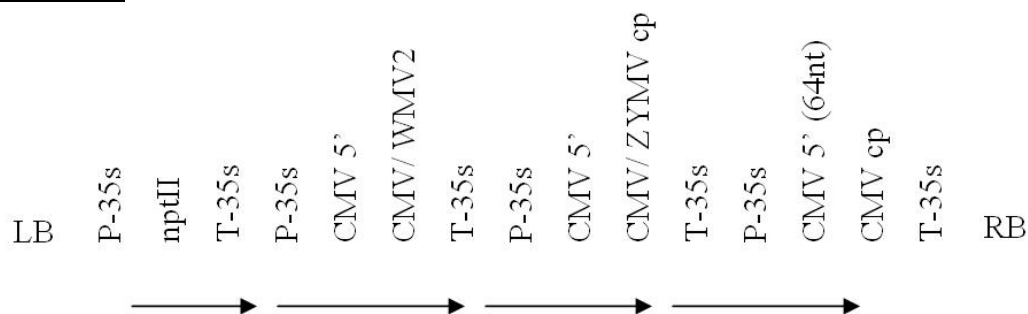
+ Điều kiện để khuếch đại là:

- Chu kỳ 1: 95⁰C trong 5 phút
- Chu kỳ 2: 95⁰C trong 30 giây
- 60⁰C trong 30 giây
- 72⁰C trong 40 giây
- } 40 chu kỳ lặp lại
- Chu kỳ cuối: 72⁰C trong 3 phút

Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% trong 1 giờ ở cường độ 40mA và đã nhuộm Ethydium bromide.

PHỤ LỤC B: MỘT SỐ PLASMID SỬ DỤNG TRONG CHUYỂN GEN THỰC VẬT

Bí Ngô



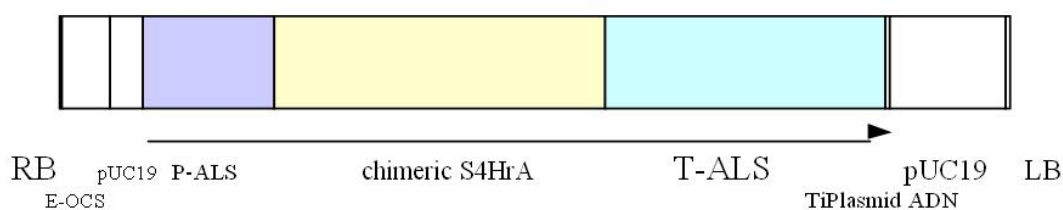
Vùng T-ADN của cấu trúc CMV73/ZYMV72/WBNB22

LB, P-35s, nptII, T-35s, P-35s, CMV 5', CMV/WMV2 cp, T-35s, P-35s, CMV 5' CMV/ZYMV cp, T-35s, RB

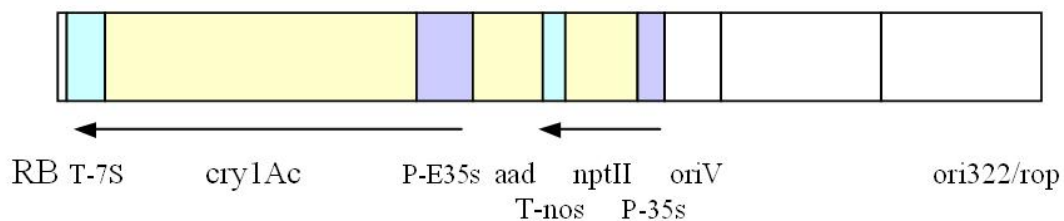


Vùng T-ADN của cấu trúc ZYMV72/WMBN22

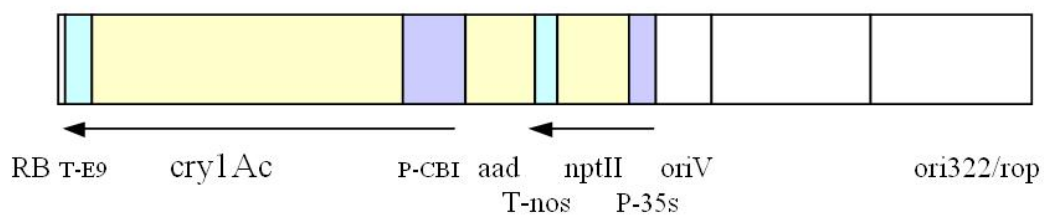
Bông



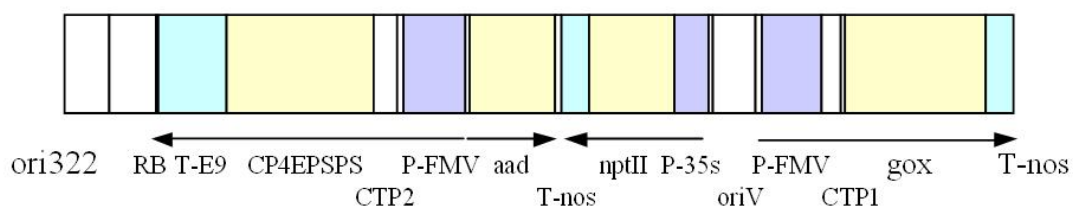
Vùng T-ADN của cấu trúc pMH26



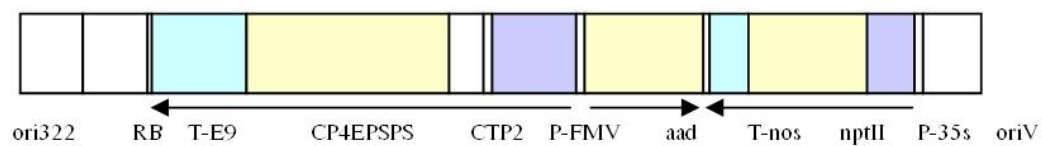
Cấu trúc PV-GHBK04 (531, 757)



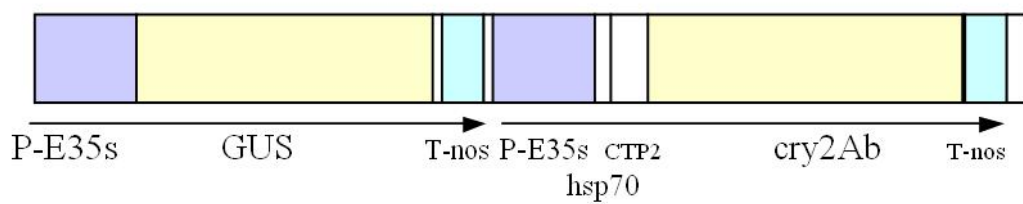
Cấu trúc PV-GHBK03 (1076)



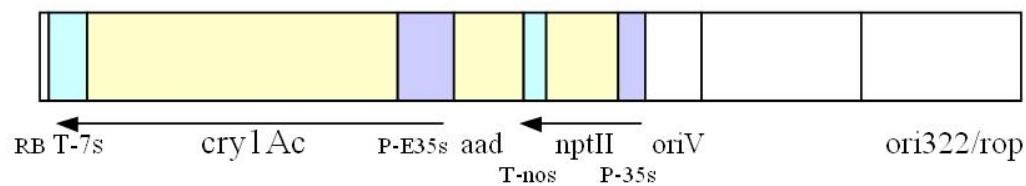
Cấu trúc pVGHGT07



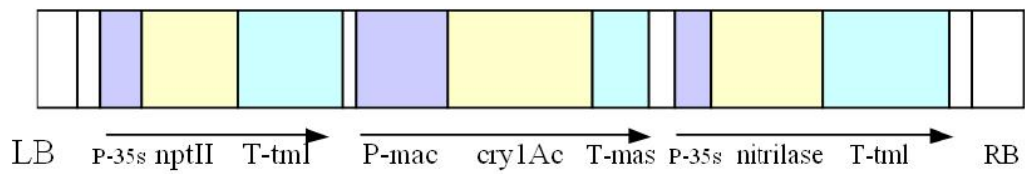
Cấu trúc PV-GHGT06



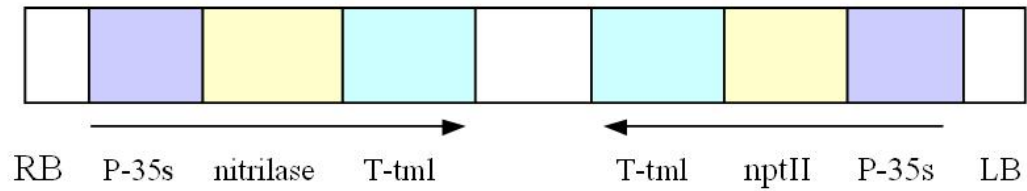
Đoạn PV-GHBK11L



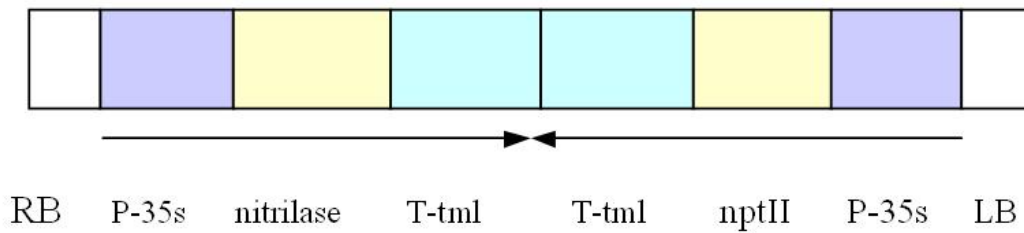
Đoạn PV-GHBK04



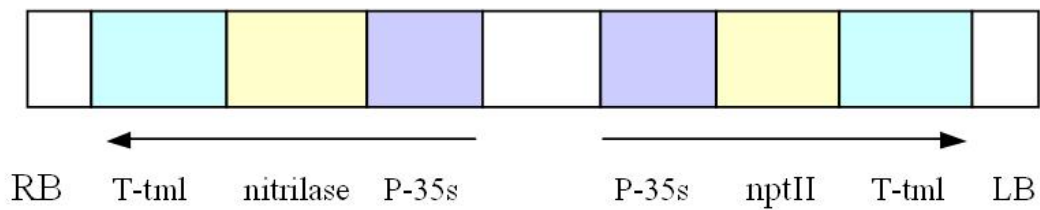
Vùng T-ADN của cấu trúc pCGN4084



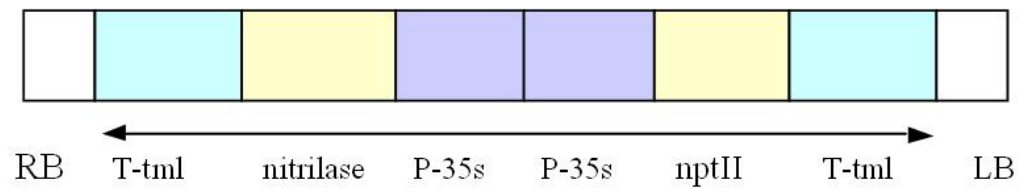
Vùng T-ADN (dòng 10103)



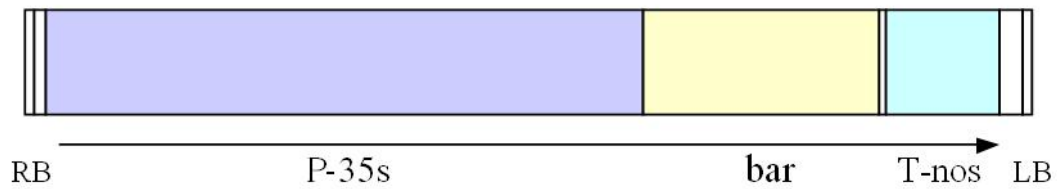
Vùng T-ADN (dòng 10109)



Vùng T-ADN (dòng 10206, 10208, 10211, 10222, 10224)

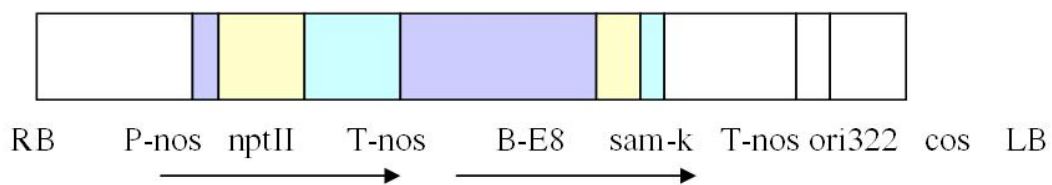


Vùng T-ADN (đòng 10209, 10215)

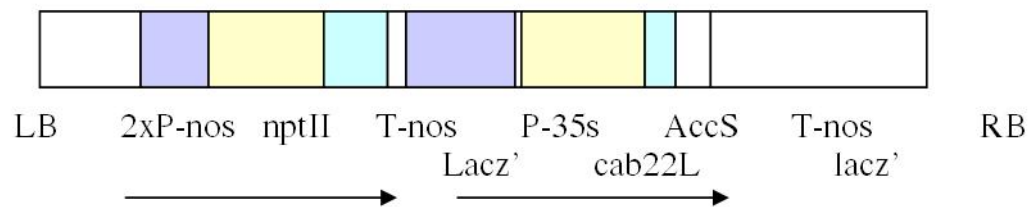


Vùng T-ADN của cấu trúc pGSV71

Cà chua



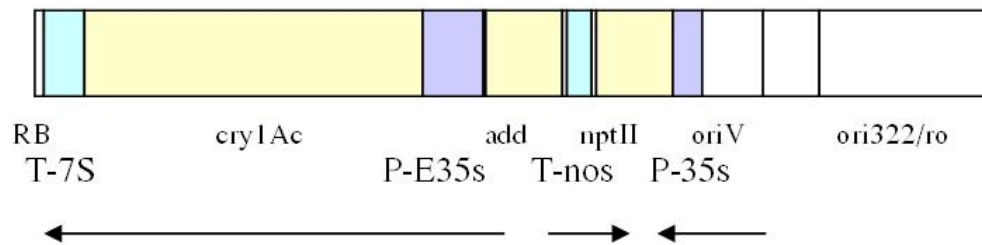
Vùng T-AND của cấu trúc pAG-5420



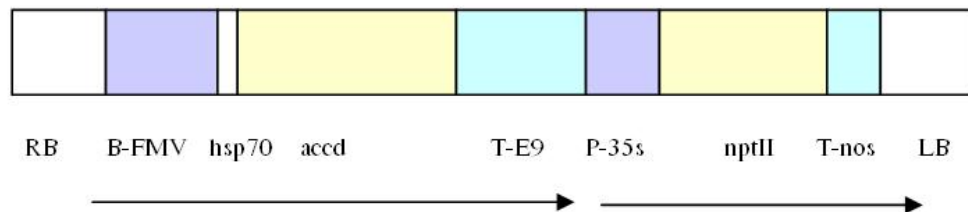
Vùng T-ADN của cấu trúc pWTT2144/AccS

Genome thực vật- AccS-nptII LB nptII-AccS RB AccS-nptII-genome thực vật

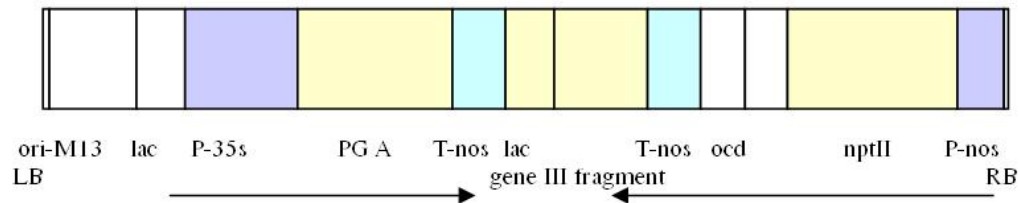
Thành phần được chèn từ cấu trúc pWTT2144/AccS



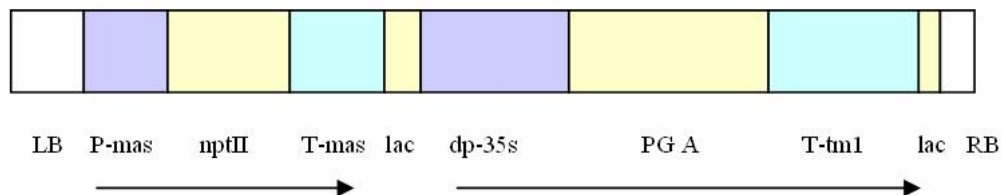
Cấu trúc PV-LEBK04



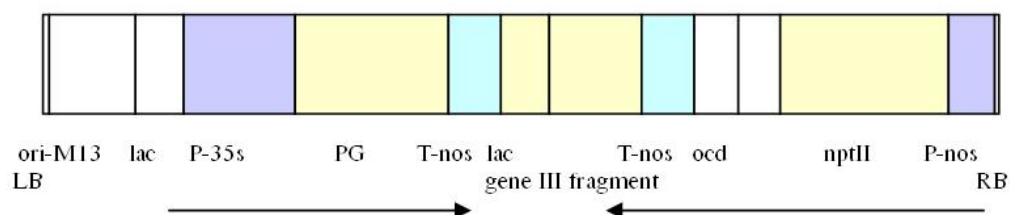
Vùng T-AND của plasmid PV-LERP07 (pMON10117)



Vùng T-ADN trong cấu trúc pJR16A

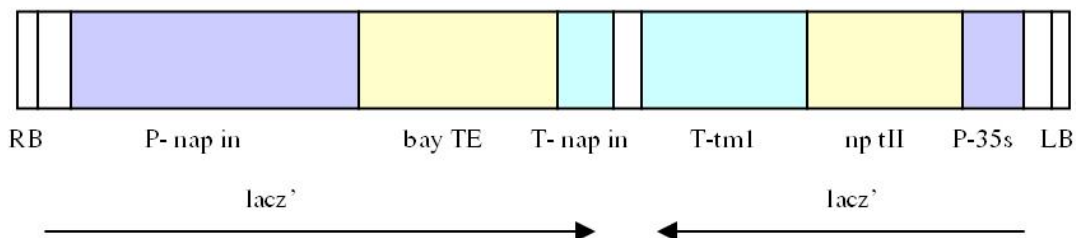


Vùng T-ADN của cấu trúc pCGN1436

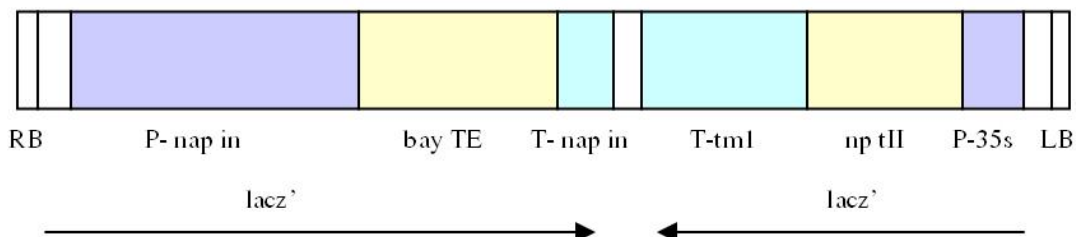


Vùng T-ADN trong cấu trúc pJR16S

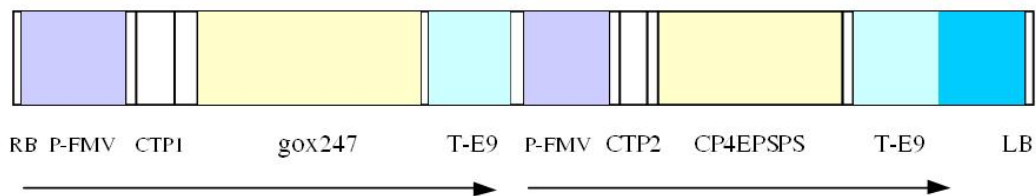
Cải Đầu



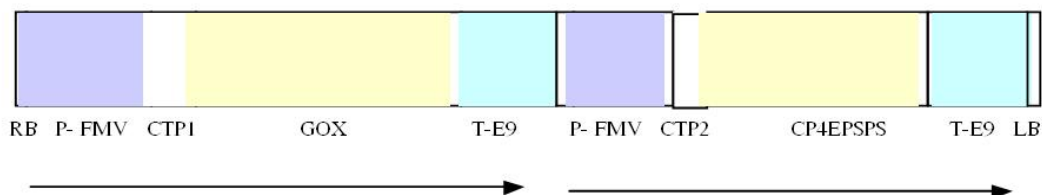
Vùng T - ADN của cấu trúc p CGN3828



Vùng T - ADN của cấu trúc p CGN3828



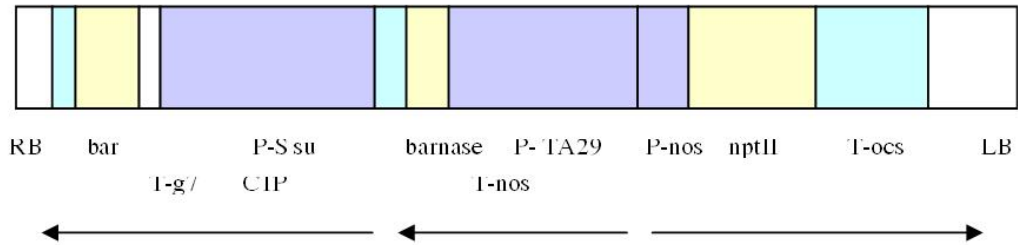
Vùng T-ADN của hình PV-BNGT04



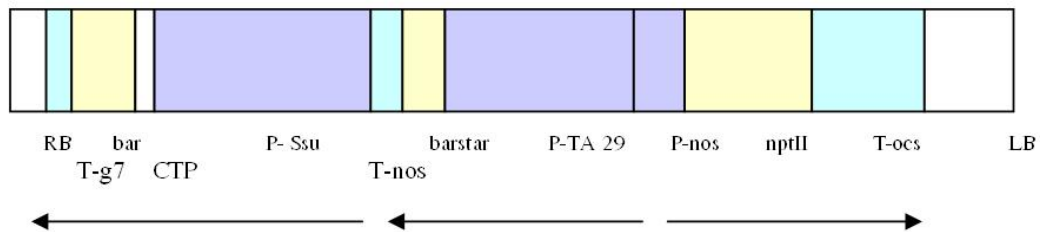
Vùng T-ADN của cấu trúc PV- BNGT03



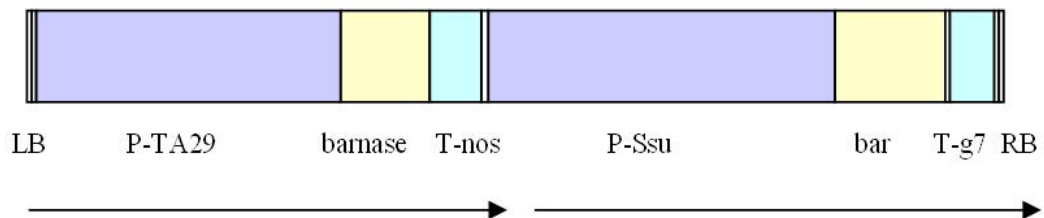
Vùng T-ADN của cấu trúc pOCA/AC



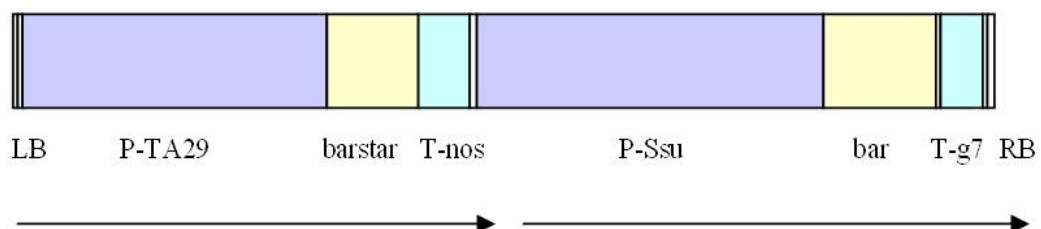
Vùng cấu trúc T-ADN của pTTM8RE



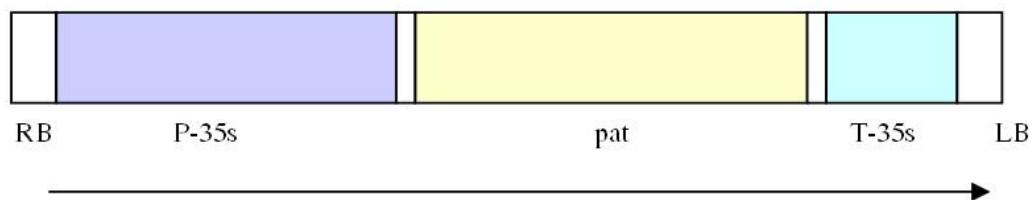
Vùng T-ADN của cấu trúc p TVE74RE



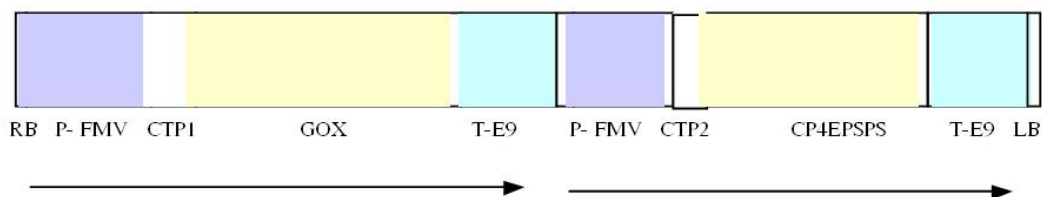
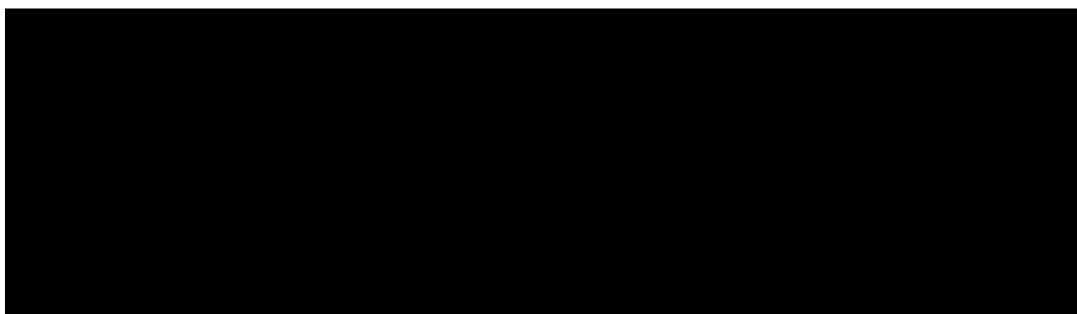
Vùng T-ADN của cấu trúc PTHW107



Vùng T-ADN của cấu trúc pTHW118

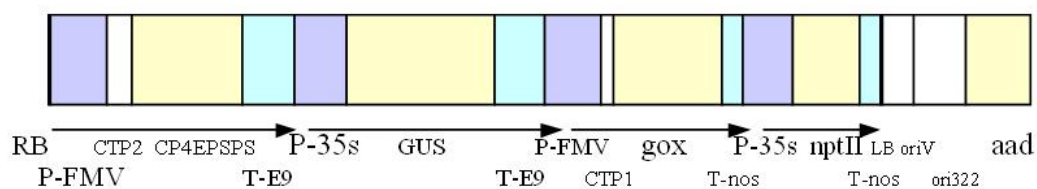


Vùng T-ADN của cấu trúc pHoe4/AC

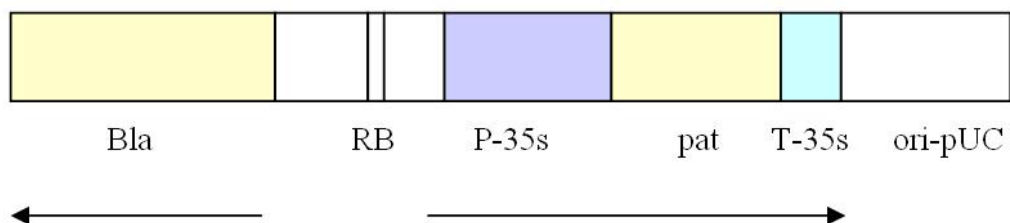


Vùng T-ADN của cấu trúc PV-BNGT03

Củ Cải đường

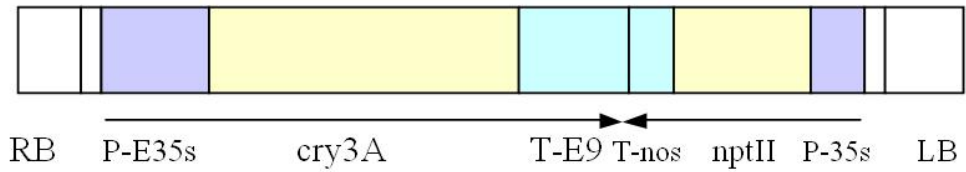


Cấu trúc PV-BVGT03

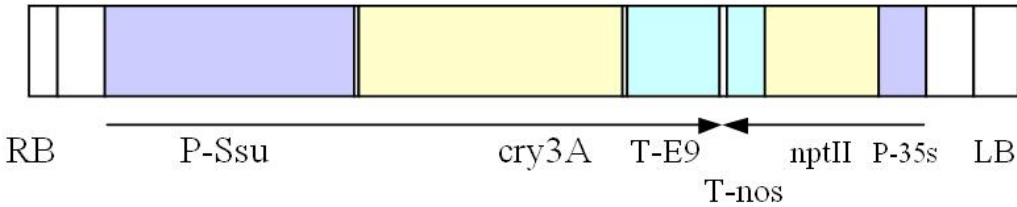


Cấu trúc pB2/35Sack (GU262)

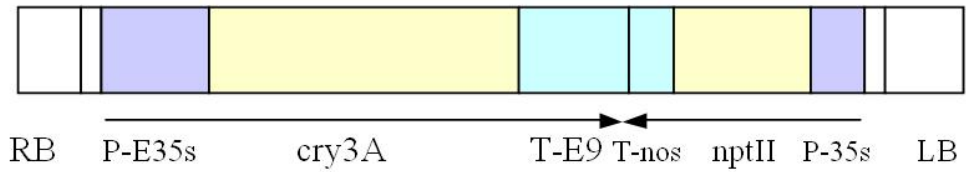
Khoai tây



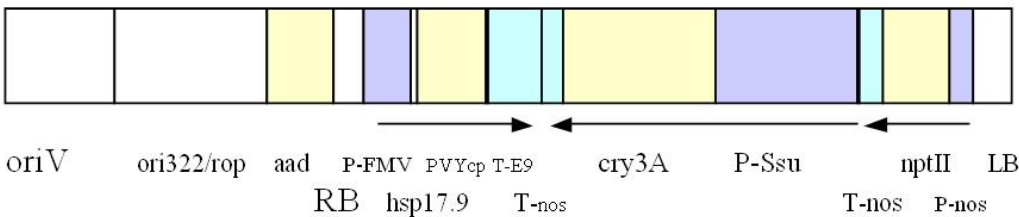
Vùng T-ADN của cấu trúc PV-STBT02 (BT6, bt10, bt12, bt16, bt17, bt18 và bt23)



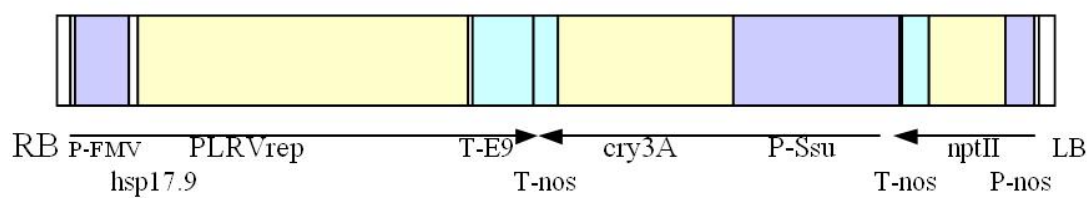
Vùng T-ADN của cấu trúc PV-STBT04



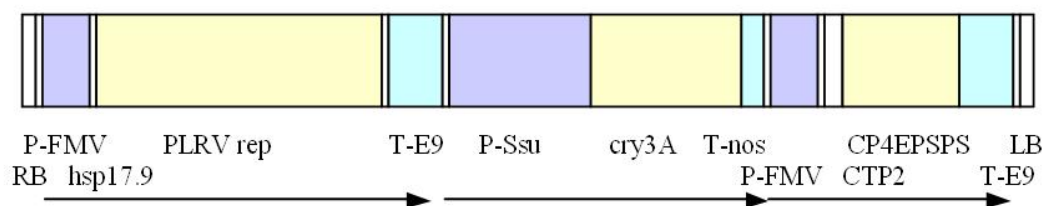
Vùng T-ADN của cấu trúc PV-STBT02 (BT6, bt10, bt12, bt16, bt17, bt18 và bt23)



Cấu trúc PV-STMT15

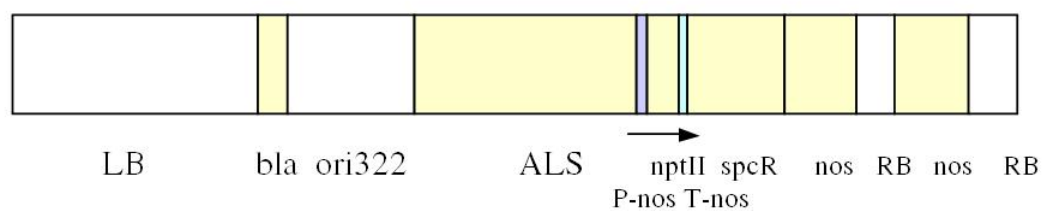


Vùng T-ADN của cấu trúc PV-STMT21



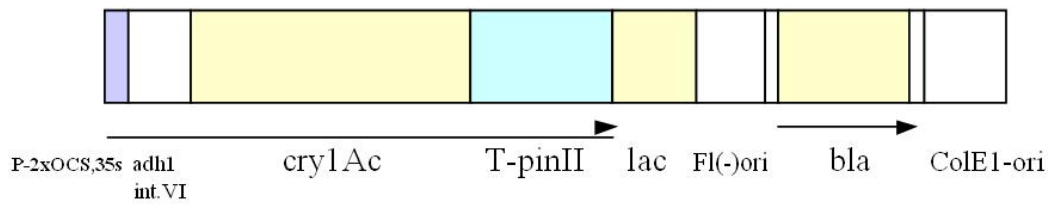
Vùng T-ADN của cấu trúc PV-STMT22

Lanh

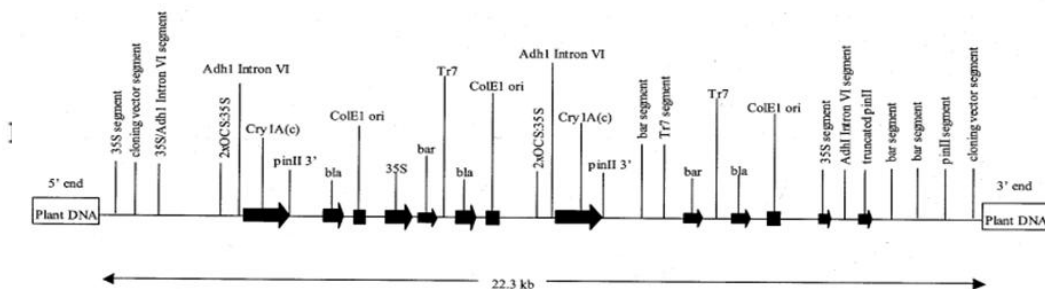


Vùng T-ADN của cấu trúc FP967

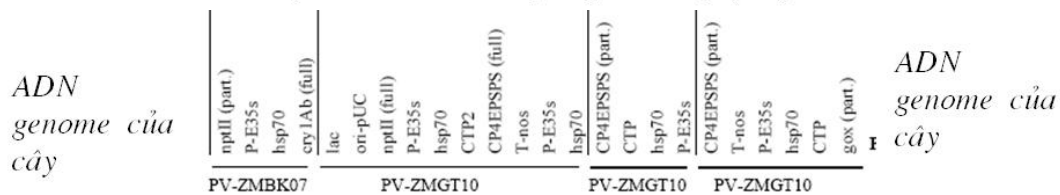
Ngô



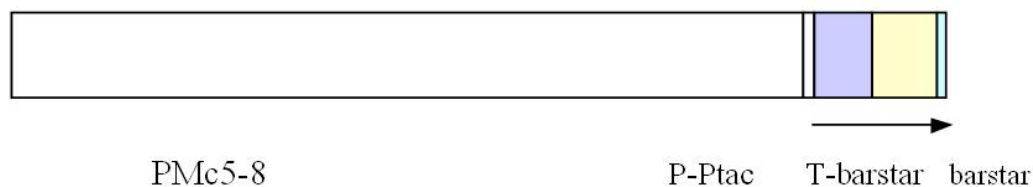
Cấu trúc pDPG699



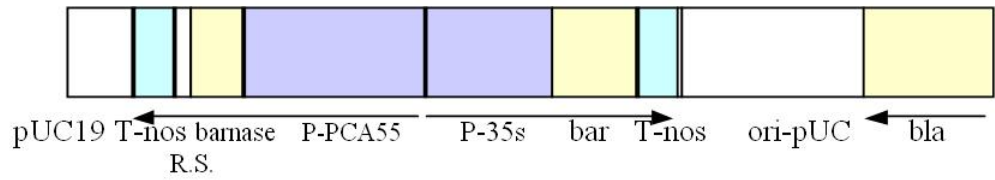
Các thành phần đã chèn vào trong dòng DBT418 (22,3 kb)



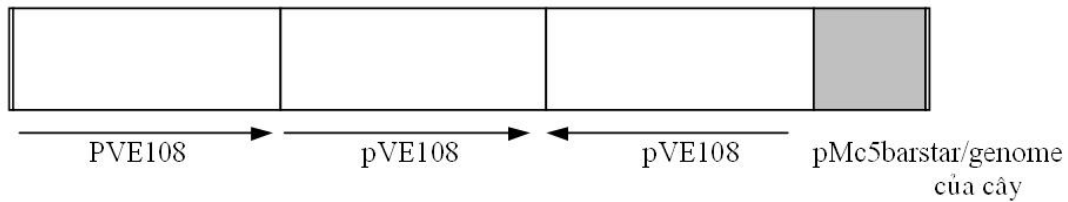
Các thành phần đã chèn từ PV-ZMBK07, PV-ZMBK10, PV-ZMBK10, PV-ZMBK1 (đoạn chèn số 2)



Cấu trúc plasmid pMc5barstar (plasmid trợ giúp: 4219 bp)

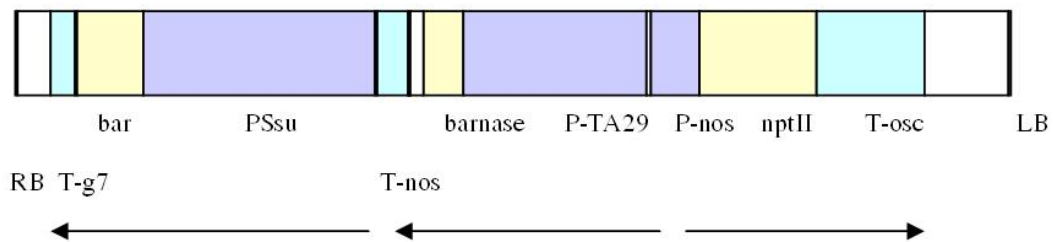


Cấu trúc plasmid pVE136

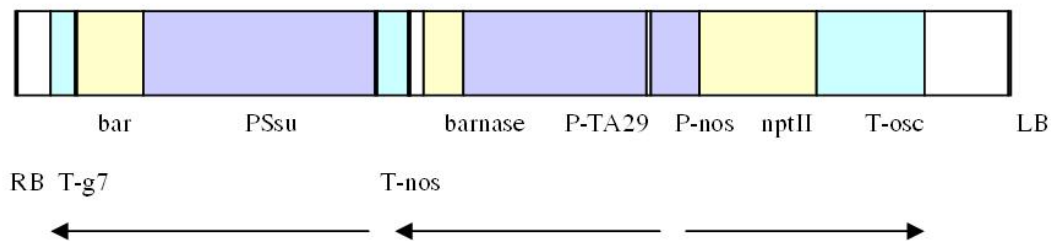


Các yếu tố đã chèn của MS3

Rau diếp xoăn

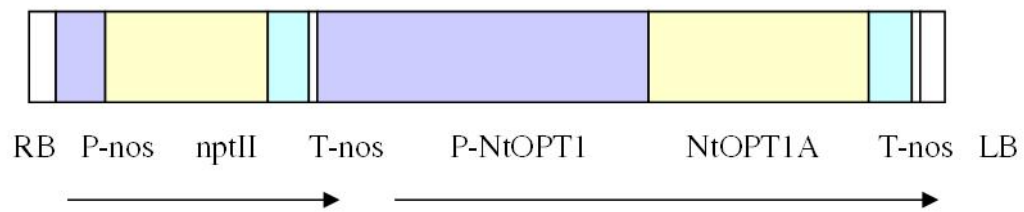


Vùng T-ADN của cấu trúc pTTM8RE (RM3-2, RM3-4, Rm3-6)



Vùng T-ADN của cấu trúc pTTM8RE (RM3-2, RM3-4, Rm3-6)

Thuốc lá



Vùng T-ADN của cấu trúc pYTY32

PHỤ LỤC C: CÁC GIỐNG LÚA CHUYỂN GEN TRÊN THẾ GIỚI

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
1	Yuukara, Matsumae	Matsumura et al. (Hokkaido Green-Bio Institute, Japan)	Gen Catalase (cat) từ cây lúa mì	Tế bào trần/ Điện áp cao	Phân tích protein và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Tăng khả năng chịu lạnh
2	Sasanishi ki	Takesawa et al. (Iwate Biotech Research Center, Japan)	Zeta glutathione S-transferase gene (ζ -GST) từ cây lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Tăng khả năng chịu lạnh
3	Dongjin	Lee et al. (Sogang University, Korea)	Gen CBF1/DREB1b từ <i>Arabidopsis</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern và Northern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu lạnh cho cây
4	Zhonghua 11	Wang et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	Manganese superoxide dismutase (MnSOD) từ đậu Hà lan	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và RT-PCR	2005	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu hạn của cây
5	Kenfeng	Cheng và Wu (Cornell Univ., USA)	<i>cor47</i> cADN từ <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tế bào huyền phù /Bản gen	PCR, Southern và Northern blot	1998	Nhà lưới	Chịu hạn
6	Pusa Basmati 1	Garg et al.. (Myongji Univ., Korea)	<i>OtsA</i> và <i>OtsB</i> mã hoá tương ứng cho trehalose-6-phosphate synthase (<i>TPS</i>) và trehalose-6-phosphate phosphatase (<i>TPP</i>) từ <i>E. coli</i>	Mô sẹo (?)/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2001	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn và chịu hạn

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
7	Tainung67	Cheng et al. (Cornell Univ, USA)	Gen <i>PMA80</i> và <i>PMA11959</i> từ cây lúa mì	Mô sẹo/ Bắn gen	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Chịu hạn
8	Nakdong	Oh et al. (Myongji University, Korea)	Gen <i>CBF3/DREB1A</i> và <i>ABF3</i> từ <i>Arabidopsis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Chịu hạn, lạnh và mặn
9	Pusa basmati 1	Surekha et al. (University of Delhi South Campus, India)	<i>Arabidopsis thaliana hsp101 (Athsp101)</i> cADN	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Northern và Western blot	2003	Phòng thí nghiệm	Tạo cây chống chịu nhiệt độ cao
10	Hoshinoyume	Murakami et al. (National Research Center for Hokkaido Region, Japan)	Gen <i>sHSH17.7</i> (Small heatshock protein)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern, Western blot, SDS-PAGE, thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới	Tăng khả năng chịu nhiệt và UV-B
11	EYI105	Hang et al. (John Innes Centre, UK)	S-adenosylmethionine decarboxylase (<i>samdc</i>) cADN từ <i>Datura stramonium</i>	Không có thông tin	PCR, RT-PCR, Southern và Northern blot	2002	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng của polyamines
12	ITA212	Capell et al. (John Innes Center, UK)	Antisense của gen arginine decarboxylase từ <i>Avena sativa</i> L.	Phôi non/ Bắn gen	PCR, RT-PCR, Southern và Northern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp của polyamine
13	M12	Noury et al. (John Innes Center, UK)	Gen Arginine decarboxylase từ <i>Avena sativa</i> L.	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp của polyamine

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
14	Zhonghua 11	Nghia et al. (University of Durham, UK)	Antisense của gen arginine decarboxylase từ <i>Avena sativa</i> L.	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, RT-PCR, Southern và Northern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu cơ chế điều khiển sự thể hiện của gen tham gia trong quá trình sinh tổng hợp polyamine
15	Zhonghua 11	Zhao et al. (Shandong Normal Univ, China)	Na ⁺ /H ⁺ antiporter gen <i>SOD2</i> từ <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn
16	Xiushui 04	Zhao et al. (Shandong Normal Univ, China)	Na ⁺ /H ⁺ antiporter gene từ <i>S. salsa</i> (<i>SsNHX1</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot và thử nghiệm sinh học	2006	Nhà lưới	Tăng khả năng chịu mặn
17	Tainung67	Ma et al. (Peking Union Medical College, China)	Calcineurin A gene từ chuột không có C-terminal autoinhibitory domain (CNAtr)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Cải thiện tính chịu mặn
18	Tainung67	Roy và Wu (Bose Institute, India)	Gen S-adenosyl-methio-nine decarboxylase (<i>samdc</i>) từ <i>Triticum aestivum</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn
19	Pusa Basmati 1	Roy và Wu (Bose Institute, India)	Arginine decarboxylase (<i>adc</i>) từ cây yến mạch	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
20	Kinuhikari	Mohanty et al. (University of Delhi, India)	Gen Choline oxidase (<i>codA</i>) từ <i>Arthrobacter globiformis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2002	Phòng thí nghiệm	Tạo cây chịu mặn
21	Kinuhikari	Hoshida et al. (Meijo Univ, Japan)	Gen <i>GS2</i> (Chloroplast glutamine synthase) từ cây lúa	Tế bào trần/ Điện áp cao	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn
22	Nipponbare	Ohta et al. (Plantech Research Institute, Japan)	Vacuolar-type Na ⁺ /H ⁺ antiporter (<i>AgNHX1</i>) từ <i>Atriplex gmelini</i>	Tế bào trần/ Điện áp cao	Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn
23	Tainung67	Zhu et al. (Cornell Univ, USA)	Gen <i>p5cs</i> (Delta 1-pyro-line-5 carboxylate synthase)	Tế bào huyền phù /Bản gen	Southern blot và thử nghiệm sinh học	1998	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn
24	Sasanishiki	Su et al. (Cornell University, USA)	Gen <i>COX</i> (Choline oxidase) từ <i>Arthrobacter pascens</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2006	Phòng thí nghiệm	Tạo cây chịu mặn
25	Notohikari	Tanaka et al. (Meijo Univ, Japan)	Gen <i>Mn-SOD</i> (Superoxide dismutase) từ nấm	Tế bào trần/ Điện áp cao	Thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn
26	Nipponbare	Saijo et al. (Kyoto Univ, Japan)	Gen <i>OsCDPK7</i> (Calcium-dependent protein kinase) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn và lạnh

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
27	Sasanishiki	Sakamoto et al. (National Institute for Basic Biology, Japan)	Gen <i>codA</i> (Cholin oxidase) từ <i>Arthrobacter globiformisi</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1998	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn và lạnh
28	Zhongzuo 321	Kishitani et al. (Tohoku Univ, Japan)	Gen <i>badh</i> (Betain aldehyde dehydrogenase) từ cây lúa mạch	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Chịu mặn, lạnh và nhiệt độ cao
29	Pusa Basmati 1	Wu et al. (Peking Univ, China)	Gen <i>nhaA</i> (Na ⁺ /H ⁺ antiporter) từ <i>E. coli</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn và chịu hạn
30	Kenfong	Rohila et al. (Cornell Univ, USA)	Gen <i>hva1</i> (Late embryogenic protein) từ lúa mạch	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Chịu hạn và các điều kiện bất lợi của môi trường
31	Nipponbare	Su và Wu (Cornell Univ, USA)	Gen Delta 1-pyrolone-5 carboxylate synthase (<i>p5cs</i>)	Tế bào huyền phù/Bản gen	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn và chịu hạn
32	Kinuhikari	Xu et al. (Cornell Univ, USA)	Gen <i>hva1</i> từ lúa mạch	Tế bào huyền phù/Bản gen	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1996	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng chịu mặn và chịu hạn
33	Nipponbare, Tsukinohikari	Hanba et al. (Okayama Univ, Japan)	Gen Aquaporin (<i>HvPIP2;1</i>) từ cây lúa mạch	Không có thông tin	Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới	Chịu mặn và tăng khả năng quang hợp của cây
34	Nipponbare	Kobayashi et al. (Univ of Tokyo, Japan)	Gen <i>Ids3</i> từ cây lúa mạch	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng hấp thụ sắt của cây

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
35	Nakdong	Zhou et al. (Ghent University, Belgium)	Gen 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (<i>OsACS5</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và In situ hybridization	2002	Phòng thí nghiệm	Vai trò của Os-ACS5 trong kháng ngập úng
36	Nipponbare	Jang et al. (Myongji University, Korea)	<i>OtsA</i> và <i>OtsB</i> mã hoá tương ứng cho trehalose-6-phosphate synthase (<i>TPS</i>) và trehalose-6-phosphate phosphatase (<i>TPP</i>) từ <i>E. coli</i>	Mô sẹo / <i>Agrobacterium</i>	Southern blot, thử nghiệm sinh học trehalase và phân tích hàm lượng carbohydrate	2003	Nhà lưới	Kháng điều kiện bất lợi của môi trường
37	M12	Xiong và Yang (Univ of Arkansas, USA)	Gen Mitogen-activated protein kinase (<i>OsMAPK5</i>) từ cây lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Kháng điều kiện bất lợi của môi trường và các loại bệnh do nấm <i>Magnaporthe grisea</i> và vi khuẩn <i>Burkholderia glumea</i>
38	Taichung 65	Bassie et al. (John Innes Center, UK)	Gen Arginine decarboxylase (<i>adc</i>) từ cây lúa yến mạch	Phôi non/ Bản gen	PCR, RT-PCR, Southern và Northern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu sự thể hiện của arginine decarboxylase gene từ yến mạch trên lúa và ảnh hưởng của nó đến sự phát triển của cây

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
39	Dongjin	Takeda et al. (Bioscience Center, Japan)	Teosinte branched 1 từ lúa (<i>OsTb1</i>),	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của <i>OsTb1</i> trong ức chế việc phát triển chồi nhánh (lateral) của lúa
40	Nakdong	Gothandam et al. (Korea University, Korea)	Antisense của gen <i>OsPPR1</i> (pentatricopeptide repeat protein) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, RT-PCR, Southern và Western blot	2005	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của gen <i>OsPPR1</i> trong quá trình phát triển của lục lạp
41	Pusa Basmati 1	Jang et al. (Myongji University, Korea)	Gen Cytochrome c (<i>OsCc1</i>) từ lúa	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu sự thể hiện của cytochrome C trên lúa và hoạt tính của promoter của nó
42	Taipei 309	Garg et al. (Cornell University, USA)	Vùng mã hoá gen <i>PHYA</i> của <i>Arabidopsis</i>	Mô sẹo (?)/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Western blot	2005	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu ảnh hưởng của việc thể hiện phytochrom A lên sự phát triển của lúa
43	Dongjin	Choi et al. (Michigan State University, USA)	Gen <i>OsEXP4</i> (Expansin)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu vai trò của <i>OsEXP4</i> trong sinh trưởng và phát triển của cây

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
44	Nipponbare	Lee et al. (Pohang Uni. Science and Technology, Korea)	<i>OsMADS16</i> cADN	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Northern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu phát triển của hoa lúa
45	Nipponbare	Fujisawa et al. (Nagoya University, Japan)	Antisense ADN của một dưới đơn vị của <i>heterotrimeric G</i> protein từ lúa	Mô sẹo/ Bản gen	Northern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của heterotrimeric G protein
46	Basmati 370	Sakamoto et al. (University of Tsukuba, Japan)	Gen GA 2-oxidase 1 (<i>OsGA2ox1</i>) từ lúa	?/ <i>Agrobacterium</i>	-	2001	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu sự thể hiện và chức năng của <i>OsGA2ox1</i> trong quá trình phát triển của cây
47	Dongjin	Fu et al. (John Innes Centre, UK)	Gen <i>GAI</i> từ <i>Arabidopsis</i>	Mô sẹo / Bản gen	PCR, PRT-PCR, Southern và Northern blot	2001	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của gen <i>GAI</i> trong quá trình sinh tổng hợp gibberellins
48	Kitaake	Jeon et al. (Pohang Univ of Science and Technology, Korea)	MADS box-gen từ lúa (<i>OsMADS1</i>)	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của gen <i>OsMADS1</i> ở lúa trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng
49	M12	Pan et al. (University of Tokyo, Japan)	Gen Antisense nucleoside diphosphate kinase (<i>NDP</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của gen <i>NDP</i> trong quá trình phát triển của cây

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
50	Nipponbare	Sentoku et al. (BioScience Center, Japan)	Gen homeobox (<i>OSH</i>) : <i>OSH1</i> , <i>OSH6</i> , <i>OSH15</i> , <i>OSH43</i> và <i>OSH71</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu sự thể hiện và chức năng của gen <i>OSH</i> trong quá trình phát triển của cây
51	Zhonghua 11	Morello et al. (University of Milan, Italy)	Gen Calcium-dependent protein kinase (<i>OsCDPK2</i>) từ lúa	Phôi non/ Bắn gen	Southern và Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu sự thể hiện và chức năng của <i>OsCDPK2</i> trong quá trình phát triển của cây
52	Notohikari	Nakagawa et al. (Nara Institute of Science and Technology, Japan)	<i>RCN1</i> và <i>RCN2</i> cADN	?/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của <i>RCN1</i> và <i>RCN2</i> trong quá trình phát triển của bông lúa
53	Culfmont	Clough et al. (University of Wisconsin, USA)	Gen Phytochrome A (<i>phyA</i>) từ lúa yến mạch (<i>Avena sativa</i>)	Phôi non/ Bắn gen	Western blot	1995	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của phytochrome A trên lúa
54	Dòng tế bào huyền phù Oc	Yang et al. (Nagoya University, Japan)	Gen phytosulfokine- α (<i>OsPSK</i>) từ lúa	Tế bào huyền phù/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR và Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng và sự thể hiện của gen <i>OsPSK</i>
55	Taipei 309, Kusabue, Jukkoku	Tang et al. (Fudan Univ, China)	<i>gna</i> và <i>Xa21</i>	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Sothern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mếp lá (<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>) và rầy

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
56	EYI105, Ewan5	Iwai et al. (National Institute of Agro-biological Sciences, Japan)	Thionin genes từ lúa yến mạch	Không có thông tin	Không có thông tin	2002	Phòng thí nghiệm	Kháng các loại bệnh nấm qua hạt như <i>Burkholderia plantarii</i> và <i>B. glumae</i>
57	Eyi105	Zhai et al. (Chinese Acad of Sciences, China)	<i>Xa21</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mếp lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
58	Minghui6, Yanhui55, Zhenxian9 7B, Peiai64, C418, Taihujing6, 8706 và Zhonghua11	Zhai et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	<i>Xa21</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2001	Nhà lưới	Kháng bệnh cháy mếp lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
59	Minghui6 3	Sharma et al. (National Institute of Sericultural and Entomological Science, Japan)	Cerporin B từ tằm (<i>Bombyx mori</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mếp lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
60	Nipponbare	Baisakh et al.. (IRRI, Philippines)	<i>Xa21</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Thử nghiệm GUS và PCR	2000	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mếp lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
61	IR68899B	Tu et al. (IRRI, Philippines)	<i>Xa21</i>	Phôi non/ Bắn gen	PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	1998	Nhà lưới	Kháng bệnh cháy mép lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
62	IR72	Zhang et al. (The Scripps Research Institute, USA)	<i>Xa21</i>	Tế bào huyền phù /Bắn gen	Southern blot và thử nghiệm sinh học	1998	Nhà lưới	Kháng bệnh cháy mép lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
63	IR64, IR72, Minghui63, BG90-2	Fitzgerald et al. (UC Davis, USA)	<i>rTGA2.1</i> - nhân tố sao chép đã được biến đổi (mutant) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern, Northern và Western blot	2005	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mép lá
64	Taipei 309	Sun et al. (Huazhong Agricultural Univ, China)	<i>Xa26</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy mép lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)
65	Mudanjiang 8	Qu et al. (Peking University, China)	Gen <i>RBBI2-3</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR	2003	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá
66	Taipei 309	Hayashi et al. (Institute of Molecular and Cellular Bio-sciences, Japan)	Gen HC-toxin reductase-like (<i>YKI</i>) từ lúa	-	-	2005	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
67	Sasanishiki	Lee et al. (Chonnam National University, Korea)	Gen Mitogen-activated protein kinase 1 (<i>MKI</i>) từ <i>Capsicum annuum</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng kháng bệnh cháy lá
68	Nipponbare	Matsumura et al. (Iwate Biotechnology Research Center, Japan)	Gen <i>AtBI 1</i> (Bax inhibitor 1) từ <i>Arabidopsis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu vai trò của <i>AtBI 1</i> trong việc ức chế quá trình chết của tế bào sau khi được xử lý bằng chiết suất của nấm gây bệnh cháy lá <i>M. grisea</i>
69	Senia	Xu et al. (Yunnan Academy of Agricultural Sciences, China)	Gen <i>Chitinase</i> từ <i>Phaseolus limensis</i> và β -1,3-glucanase từ <i>Nicotiana tabacum</i>	Không có thông tin	PCR	2003	Không có thông tin	Kháng bệnh cháy lá
70	Nan29	Stark-Lorenzen et al. (Max-Planck Institut fur Zuchtungsforschung, Germany)	Gen Stilbene synthase từ cây nho	Tế bào trần/ PEG	Southern blot và thử nghiệm sinh học	1997	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
71	Nipponbare	Gandikota et al. (Univ of Hyderabad, India)	Gen Anthocyanin (<i>c1, r, c2</i>) từ ngô	Mô sẹo/ Bắn gen	Southern, Western và thử nghiệm sinh học	2001	Nhà lưới	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
72	Taipei 309	Iton et al. (Niigata Univ, National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Gen <i>ChiC</i> (Bacterial family 19 chitinase) từ <i>Streptomyces griseus</i> HUT6037	Hạt nảy mầm/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
73	Nipponbare	Kanzaki et al. (Iwate Biotechnology Center, Japan)	Gen <i>Defensin</i> từ cây wasabi (<i>Wasabia japonica</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
74	Sasanishiki	Nishizawa et al. (National Institute of Agrobiological Resources, Japan)	Các gen chitinase nhóm I từ lúa (<i>cht-2</i> và <i>cht-3</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern , Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm và nhà lưới	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
75	Nipponbare Koshihikari	Nishizawa et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Beta-glucanase (<i>gnsI</i>) từ cây lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
76	Nipponbare	Sawada et al. (Research Association for Biotechnology, Japan)	Gen <i>OsSBP</i> (selenium-binding protein) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>) và cháy mép lá (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
77	Kinmaze	Coca et al.. (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Spain)	Cecropin A từ <i>Hyalophora cecropia</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
78	Senia	Coca et al.. (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Spain)	Gen kháng nấm (<i>afp</i>) từ <i>Aspergillus giganteus</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>)
79	Senia	Feng và Li (Zhongshan University, China)	Gen <i>Chitinase</i> (<i>RC24</i>) từ lúa, glucanase (<i>beta-Glu</i>) từ cô linh lăng, ribosome-inactivating protein (<i>B-RIP</i>) từ lúa mạch	Bản gen	Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá và cháy mép lá
80	Qisiruanzhan	Krishnamurthy et al. (Montana State University, USA)	Puroindoline (gen <i>pinA</i> và <i>pinB</i>) từ lúa mì	Không có thông tin	Không có thông tin	2001	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh cháy lá và cháy mép lá
81	Ishikari-shiroge	Kim et al. (Myong Ji Univ, Korea)	Gen <i>b-23</i> Ribosome-inactivating protein (<i>Zm-crip3a</i>) từ ngô	?/ Bản gen	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Nhà lưới	Kháng bệnh

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
82	Nipponbare	Higa et al. (Plant Science Center, Japan)	Gen kháng Trichothecene (<i>tri101</i>) và gen khử độc zearalenone (<i>zdh101</i>)	?/ Bắn gen	RT-PCR, Southern và Northern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh do nấm <i>Fusarium</i>
83	Nipponbare	Kim et al.. (Myongji Univ, Korea)	Gen <i>mod1</i> (Ribosome-inactivating protein) từ ngô và chitinase (<i>rch10</i>) từ cây lúa	Tế bào huyền phù /Bắn gen	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng bệnh khô vằn (<i>Rhizoctonia solani</i>)
84	Kenfong	Datta et al. (IRRI, Philippines)	Gen <i>PR-3 chitinase</i> từ lúa	Tế bào trần, phôi non/ PEG và bắn gen	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh khô vằn (<i>Rhizoctonia solani</i>)
85	Vaidehi và Tulsi	Datta et al. (IRRI, Philippines)	Gen Chitinase (<i>Chil1</i>) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, protein và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh khô vằn (<i>Rhizoctonia solani</i>)
86	IR72,IR64, IR68899B, MH63, Chinsurah Boro II	Datta et al.. (IRRI, Philippines)	Gen <i>t1p</i> (Thaumatococcus-like protein)	Tế bào trần và phôi non/ PEG và bắn gen	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm và nhà lưới	Kháng bệnh khô vằn (<i>Rhizoctonia solani</i>)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
87	Basmati 112, Tulsi, Vaidehi	Upadhyaya et al..	ADN cùng chiều và ngược chiều của các đoạn gen số 7 và 10 (không là gen cấu trúc) và 5, 8, và 9 (gen cấu trúc) của virus RRSV (Rice Ragged Stunt Virus)	Mô sẹo/ Bắn gen và <i>Agrobacterium</i>	Quan sát	1998	Nhà lưới	Kháng bệnh ragged stunt virus (Bệnh lùn xoắn lá ?) trên lúa
88	Chinsurah Boro II, IR72, IR51500	Han et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	ADN tổng hợp mã hoá cho đoạn hammerhead ribosome với mục tiêu là mRNA của virus gây bệnh lùn ở lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, RT-PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2000	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng bệnh lùn xoắn lá
89	Taipei 309 và Chinsurah Boro II	Zheng et al. (Peking Univ, China)	Gen mã hoá cho đoạn lớn nhất (đoạn số 8) của virus gây bệnh lùn trên lúa (<i>RDVS8</i>)	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Western blot	1997	Phòng thí nghiệm	Kháng bệnh lùn xoắn lá
90	Tongling 1	Zheng et al. (Peking University, China)	Protein vỏ P8 và core protein lõi P3 của virus gây bệnh lùn trên lúa	Mô sẹo/ Bắn gen	Southern và Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu kết hợp của các thành phần của RDV
91	Zhonghua8 Zhonghua10	Dai et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	Protein <i>bZIP</i> , gen <i>RF2b</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2004	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu cơ chế của bệnh lùn xoắn lá (rice tungro virus)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
92	Cica8	Yang et al. (University of Arkansas, USA)	Gen Salicylate hydroxylase (<i>nahG</i>) từ <i>Pseudomonas putida</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Tạo dòng lúa không có salicylic acid dùng nghiên cứu tính kháng bệnh của cây trồng
93	ITA212, Bouake189, BG90-2	Jang et al. (Chonnam National Univ, Korea)	Gen N-(hydroxycinnamoyl) transferase (<i>tht</i>) từ cây tiêu	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng các chất dẫn xuất của serotonin trong rễ có khả năng gia tăng sức đề kháng các tác nhân gây bệnh trên cây
94	Nakdong	Wang et al.. (China National Rice Research Institute, China)	Gen Cecropin B (kháng khuẩn, có nguồn gốc từ côn trùng) và gen <i>bar</i> (kháng thuốc trừ cỏ, dùng cho thanh lọc cây chuyển gen)	Mô sẹo và tế bào huyền phù / Bắn gen	Southern blot	1998	Phòng thí nghiệm	Kháng vi khuẩn và nghiên cứu mối liên hệ giữa việc kết nối của gen được chuyển vào bộ gen cây và sự thể hiện của nó.
95	Nipponbare	Lee et al. (Chonnam National Univ, Korea)	Gen 5-epi-aristolochene (<i>EAS</i>) từ cây tiêu	Mô sẹo / <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng kháng bệnh của cây
96	Jia 59, Chun Jiangzhao 4 và Bing 93-63	Uchimiya et al. (Univ of Tokyo, Japan)	Gen <i>yl1</i> từ lúa	Mô sẹo / <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm và nhà lưới	Kháng bệnh cháy lá (<i>Magnaporthe grisea</i>) và điều kiện bất lợi của môi trường

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
97	Taipei 309	Datta et al. (IRRI, Philippines)	<i>Xa21</i> , chitinase <i>RC7</i> và <i>Bt</i>	Lai giữa các dòng đã được biến nạp các gen riêng lẻ	PCR, RT-PCR, Southern, Northern và Western blot	2002	Phòng thí nghiệm	Tạo cây kháng sâu bệnh
98	Nipponbare	Heaton et al. (University of Georgia, USA)	Gen Mercuric reductase (<i>merA</i>) từ vi khuẩn	?/ Bản gen	Không có thông tin	2003	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa có khả năng hấp thu thủy ngân cao dùng làm sạch môi trường
99	IR72	Chiang et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Gen Amylopullulanase (<i>apu</i>) từ <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Phân tích protein, ELISA và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Giảm hàm lượng amylose trong hạt gạo
100	Tainung67	Lee et al.. (National Chung-Hsing Univ, Taiwan)	2S albumin (<i>s2sa</i>) từ cây mè	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2003	Nhà lưới	Tăng hàm lượng methionine và cysteine trong hạt gạo
101	Nagdongbuoyo	Hamada et al. (Mitsui Chemicals, Japan)	Gen Phytase từ <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Cải thiện hàm lượng phosphate dễ tiêu cho thức ăn chăn nuôi
102	Tainung67	Hong et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Gen Phytase từ <i>Selenomonas ruminantium</i> (SrPf6) và <i>E coli</i> (<i>appA</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Cải thiện hàm lượng phosphate dễ tiêu cho thức ăn chăn nuôi

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
103	Kinuhikari	Capell et al.. (John Innes Center, UK)	Gen Arginine decarboxylase từ yến mạch	Không có thông tin	Phân tích mRNA và polyamines trong mô	1999	Phòng thí nghiệm	Cải thiện dinh dưỡng về polyamin
104	Tainung67	Maruta et al. (Japan Tobacco Inc, Japan)	Gen Glutelin A - đoạn antisense	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và phân tích protein	2001	Phòng thí nghiệm	Làm giảm hàm lượng glutelin trong hạt dùng sản xuất rượu sake
105	Tsukinohikari	Zhu et al. (CSIRO Plant Industry, Australia)	Thành phần của hệ thống bẫy dựa trên <i>Ac/Ds</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, TAIL-PCR, Southern blot, phân tích đoạn ADN kề bên	2003	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
106	EM10	Jin et al. (Zhejiang Univ, China)	Thành phần của hệ thống bẫy dựa trên <i>Ac/Ds</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot, phân tích đoạn ADN kề bên và thử nghiệm <i>GUS</i>	2004	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
107	Nipponbare	Zhu et al. (National Rice Research Institute, China)	Gen Transposon <i>Ac/Ds</i> từ cây thuốc lá	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Không có thông tin	2001	Không có thông tin	Tạo các dòng đột biến bằng transposon dùng cho nghiên cứu genome học chức năng
108	Zhonghua 11	Ito et al. (National Institute of genetics, Japan)	Thành phần của hệ thống bẫy dựa trên <i>Ac/Ds</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, TAIL-PCR, Southern blot, phân tích đoạn ADN kề bên và thử nghiệm <i>GUS</i>	2004	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
109	Zhonghua No. 11	Nakagawa et al. (Tohoku University, Japan)	Thành tố dịch chuyển không tự động của <i>Ac</i> ở ngô	?/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và Southern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu khả năng di chuyển của <i>Ac/Ds</i> dùng cho nghiên cứu genome học chức năng
110	Nipponbare	Chin et al. (Gyeongsang National Univ, Korea)	Thành phần của hệ thống bẫy dựa trên <i>Ac/Ds</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, TAIL-PCR, Southern blot, phân tích đoạn ADN kề bên và thử nghiệm <i>GUS</i>	1999	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
111	Dong Jin	Murai et al. (Louisiana State University, USA)	Gen <i>Ac</i>	Tế bào trần/ PEG	Southern blot	1991	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của <i>Ac</i> transposon trên lúa
112	Nipponbare	Kumar et al. (UC Davis, USA)	Thành phần của hệ thống bẫy dựa trên enhancer/ suppressor mutator (En/Spm) từ ngô và gen chỉ thị GFP	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Excision PCR, Southern, Northern blot, phân tích đoạn ADN kề bên và quan sát thể hiện của gen chỉ thị	2005	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
113	Nipponbare	Johnson et al. (Univ of Cambridge, UK)	Hệ thống bẫy gen <i>UAS/GAL4-VP16</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i> và <i>GFP</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Quan sát thể hiện của gen chỉ thị <i>GUS</i> và <i>GFP</i>	2005	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
114	Nipponbare	Wu et al. (Huazhong Agricultural Univ, China)	Hệ thống bẫy gen <i>UAS/GAL4-VP16</i> và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot, phân tích đoạn ADN kề bên và quan sát thể hiện của gen chỉ thị <i>GUS</i>	2003	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
115	Zhonghua 15	An et al. (Pohang Univ of Science and technology, Korea)	Thành phần của hệ thống bẫy gồm vùng điều khiển của 35S và gen chỉ thị <i>GUS</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	iPCR, phân tích đoạn ADN kề bên và thử nghiệm <i>GUS</i>	2003	Nhà lưới	Tạo quần thể đột biến cho nghiên cứu genome học chức năng
116	Dong Jin, Hwayoung	Hirose et al.. (National Institute of Agrobiological Sciences và Kobe Univ, Japan)	<i>CYP2B6</i> , a cytochrome P450 monooxygenase	? / <i>Agrobacterium</i>	Thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Kháng nhiều loại thuốc trừ cỏ
117	Nipponbare	Kawahigashi et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Cytochrome P450 genes (<i>cyp1A1</i> , <i>cyp2B6</i> và <i>cyp2C19</i>) từ người	?/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Kháng thuốc diệt cỏ
118	Notohikari	Jung et al. (Scigen Harvest Research Center, Korea)	Gen Protox (protoporphyrinogen oxidase) từ <i>Bacillus subtilis</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Kháng thuốc diệt cỏ gốc diphenyl ether
119	Nipponbare	Shimizu et al. (Mie Univ và National Institute for Agro-Environmental Sciences, Japan)	Chlorocatechol dioxygenase (<i>cbnA</i>) từ <i>Ralstonia eutropha</i> NH9	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Phân huỷ hợp chất clorua vòng thơm (chloroaromatic- thành phần chính trong thuốc bảo vệ thực vật và dung môi hữu cơ) trong đất và nước

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
120	IR72	AgrEvo company (USA)	Phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) (bar gene) từ <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Mô sẹo/ Biến nạp trực tiếp	Southern blot	1998	Sản xuất	Kháng thuốc trừ cỏ
121	Nipponbare	Inui et al. (Kobe Univ, Japan)	Gen <i>CYP2C9</i> và <i>CYP2C19</i> (Drug-metabolizing cytochrome P450) từ người	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Kháng nhiều loại thuốc trừ cỏ
122	Nipponbare	Kawahigashi et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Gen <i>CYP2B6</i> (Drug-metabolizing cytochrome P450) từ người	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Kháng nhiều loại thuốc trừ cỏ
123	Bengal và M202	Maqbool et al. (John Innes Center, UK)	<i>Cry2A</i>	Mô sẹo/ Bản gen	PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1998	Phòng thí nghiệm	Kháng các loại sâu đục thân
124	M7, Basmati 370	Chaogang et al. (Academia Sinica, China)	Gen mã hoá cho đoạn số 9 của virus gây bệnh cần cổ ở lúa (<i>RRSV S9</i>)	Mô sẹo / <i>Agrobacterium</i>	PCR, RT-PCR, Southern blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	2003	Nhà lưới	Kháng rầy nâu
125	Jarrah	Nagadhara et al. (Osmania Univ, India)	Gen <i>gna</i> (Galanthus nivalis agglutinin)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới	Kháng rầy nâu (BPH)
126	Chaitanya	Lee et al. (Gyeongsang Univ, Korea)	Gen <i>SKTI</i> (Kunitz trypsin inhibitor) từ cây đậu tương	Tế bào trần/PEG	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Nhà lưới	Kháng rầy nâu (BPH)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
127	Nagdongb uyo	Sudhakar et al.. (John Innes Center, UK)	Gen <i>gna</i> (Galanthus nivalis agglutinin)	Phôi non/ Bắn gen	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1998	Nhà lưới	Kháng rầy nâu (BPH)
128	ASD16, M5, M12 và FX92	Tinjuanojun et al.. (John Innes Center, UK)	Gen <i>gna</i> (Galanthus nivalis agglutinin)	Phôi non/ Bắn gen	Southern and Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Kháng rầy nâu (BPH)
129	Eyi105, Bengal	Loc et al. (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Gen <i>gna</i> và <i>CryIA(c)</i>	?/ Bắn gen	PCR, Southern và Western blot	2001	Nhà lưới	Kháng rầy nâu và sâu đục thân
130	Khao Dawk Mali 105 và Supanburi 60	Loc et al. (Univ of Durham, UK)	Gen <i>gna</i> và <i>CryIA(c)</i>	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Kháng rầy nâu (BPH) và sâu đục thân
131	EYI105, Bengal	Saha et al. (Bose Institute, India)	Gen Agglutinin từ lá của <i>Allium sativum</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Northern, phân tích protein, xác định vị trí của transgene trên các nhiễm sắc thể và thử nghiệm sinh học	2006	Nhà lưới	Kháng các loại rầy
132	IR64	Qiu et al. (Chinese Academy of Sciences và Peking University, China)	Gen <i>spI</i> (spider insect toxin)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern và thử nghiệm sinh học	2001	Nhà lưới	Kháng sâu cuốn lá (<i>Cnaphalocrosis medinalis</i>) và sâu đục thân (<i>Chilo suppressalis</i>)

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
133	Xiushui 11, Chunjiang 11	Maqbool et al. (John Innes Center, UK)	<i>CryIA(c)</i> , <i>Cry2A</i> và <i>gna</i>	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Kháng các loại sâu cuốn lá, đục thân và rầy nâu
134	M7, Basmati 370	Wu et al. (Zhejiang University, China)	Gen <i>CryIA(b)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	-	2002	Phòng thí nghiệm	Tạo lúa kháng sâu
135	Xiushui 11	Ye et al. (Zhejiang University, China)	Gen <i>CryIA(b)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	Không có thông tin	Không có thông tin	2001	Ruộng thí nghiệm	Tạo lúa kháng sâu
136	Xiushui 11	Fujimoto et al. (Plantech Research Institute, Japan)	Gen <i>CryIA(b)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	Không có thông tin	Không có thông tin	1993	Phòng thí nghiệm	Tạo lúa kháng sâu
137	IR58	Tu et al. (IRRI, Philippines)	Gen hợp nhất N-terminal của <i>CryIA(b)</i> và C-terminal của <i>CryIA(c)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	?/ Bắn gen	Western blot	2000	Ruộng thí nghiệm	Tạo lúa kháng sâu
138	Minghui 63	Kumpatla và Hall (Texas A&M University, USA)	<i>CryIIIA</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> , gen <i>cryIIIA</i>	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	1998	Phòng thí nghiệm	Tạo giống kháng sâu
139	Taipei 309	Yoza et al. (National Food Research Institute, Japan)	Gen Avidin từ gà với đoạn ADN mã hoá cho 25 amino acid của alpha amylase signal peptide từ lúa mạch	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2005	Nhà lưới	Kháng các loại côn trùng trong quá trình bảo quản hạt như <i>Tribolium confusum</i> và <i>Sitotroga cerealella</i>

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
140	Nipponbare	Cheng et al.. (Univ. of Ottawa, Canada)	<i>CryIA(b)</i> và <i>CryIA(c)</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	1998	Nhà lưới	Kháng các loại sâu đục thân (<i>Chilo suppressalis</i> và <i>Scirpophaga incertulas</i>)
141	Nipponbare, Zhong8215, 93VA, ZAU16, 91RM, T8340, Pin92-528, T90502 và Kaybonnet	Shu et al. (Zhejiang Univ, China)	<i>CryIA(b)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	ELISA và thử nghiệm sinh học	2000	Nhà lưới	Kháng các loại sâu đục thân
142	Xuishui11	Wu et al. (Peking Univ, China)	<i>CryIA(b)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Ruộng	Sâu đục thân
143	Xuishui11	Xue et al..(Zhejiang Agricultural Univ., China)	Gen <i>pin2</i>	Tế bào huyền phù /Bản gen	ADN dot blotting	1995	Thử nghiệm ngoài đồng	Kháng thuốc trừ cỏ Basta TM và sâu đục thân (<i>Chilo suppressalis</i> và <i>Sesamia inferens</i>)
144	Taipei 309, Tainung 67, Pi4	Chen et al. (Huazhong Agricultural Univ, China)	<i>Cry2A(a)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và phân tích protein	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo cây kháng sâu
145	Minghui 63	Cotsaftis et al. (CIRAD, France)	<i>CryIB</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Kháng sâu đục thân

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
146	Ariete	Khanna và Raina (National Research Center on Plant Biotechnology, India)	<i>CryIA(c)</i> từ <i>Bacillus thuringiensis</i>	Mô sẹo/ Bắ gen và <i>Agrobacterium</i>	PCR, RT-PCR, Southern và Western blot và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Kháng sâu đục thân (<i>Scirpophaga incertulas</i>)
147	IR64, Pusa Basmati và Karnal Local	Nayak et al. (Bose Institute, India)	<i>CryIAC</i>	Mô sẹo/ Bắ gen	PCR, Northern, Western blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	1997	Phòng thí nghiệm	Kháng các loại sâu đục thân
149	IR64	Ramesh et al. (Osmania Univ, India)	<i>CryIA(b)</i> và <i>CryIA(c)</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và Southern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Tạo cây kháng sâu
150	IR58025A, IR58025B và Vajram	Mochizuki et al. (Tohoku National Agricultural Experiment Station, Japan)	Trypsin inhibitor gene (wti-B) từ cây Winged bean	?/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm	Kháng sâu đục thân
151	Nipponbare	Datta et al.. (IRRI, Philippines)	<i>CryIA(b)</i>	Phôi non/ Bắ gen	Southern Blot và Western blot	2002	Phòng TN	Kháng sâu đục thân
152	IR65600-42-5-2	Duan et al.. (Cornell University, USA)	Proteinase inhibitor II (<i>pin2</i>) từ khoai tây		molecular analyses	1996	Nhà lưới	Kháng sâu đục thân màu hồng (<i>Sesamia inferens</i>)
153	Japonica rice varieties	Kumpatla et al.. (Texas A & M Univ., USA)	Gen <i>CryIIIA</i> và <i>bar</i>	? / Bắ gen	PCR và Southern blot	1997	Phòng thí nghiệm	Kháng sâu đục thân
154	Nàng Thơm Chợ Đào, Một Bụi	Ho et al. (Institute of Tropical Biology, Vietnam)	<i>CryIA(b)-CryIB</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern, Western blot	2001	Nhà lưới	Kháng sâu đục thân

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
155	Taipei 309	Ramesh et al. (Osmania Univ, India)	<i>CryIA(b)</i> , <i>CryIA(c)</i> và <i>gna</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Kháng sâu đục thân và loại côn trùng chích hút
156	Chaitanya, Phalguna, Swarna, IR58025A, IR58025B và Vajram	Rao et al. (Purdue University, USA)	Gen <i>gna</i> (Galanthus nivalis agglutinin)	Tế bào trần/ Điện áp cao và Phôi non/ Bắn gen	PCR, Southern và Western blot	1998	Phòng thí nghiệm	Tạo lúa kháng sâu
157	Radon, Nortai, ASD15, M5 và M12	Julio et al. (ETS Ingenieros Agronomos, Spain)	Gen <i>Itr1</i> (Trypsin inhibitor BTI-CMe) từ lúa mạch	Mô sẹo và phôi non/ Bắn gen	PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Kháng các loại mọt trong quá trình bảo quản hạt
158	IR58, Senia	Ma et al. (Sichuan Agricultural Biotechnology Engineering Research Center, China)	Gen <i>gna</i>	?/ Bắn gen	PCR, Southern blotting and Western blotting	2003	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa kháng sâu
159	D297B	Li et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	Gen lectin từ cây giöt tuyết (<i>gna</i>) và trypsin inhibitor (<i>sbt1</i>) từ đậu tương	Không có thông tin	PCR và Southern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo cây kháng sâu
160	Zhuxian B	Foissac et al. (Univ of Durham, UK)	Gen <i>gna</i>	Phôi non/ Bắn gen	Western blot và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Rầy xanh và rầy nâu

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
161	ASD16, M12	Sivamani et al. (Montana State Univ, USA)	Protein vỏ (<i>cp1</i> , <i>cp2</i> và <i>cp3</i>) của virus hình cầu Tungro ở lúa (RTSV)	Phôi non và Tế bào huyền phù / Bắn gen	PCR, Southern, Northern blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	1999	Nhà lưới	Kháng rầy xanh Nephotettix virescens
162	Kinuhikari	Su et al. (Cornell University, USA)	Đoạn <i>ABRC1</i> từ gen <i>HVA22</i> của lúa mạch (<i>Hordeum vulgare</i> L.) cùng với các biên thể (kích thước) khác nhau của promoter <i>Act1</i> từ lúa với <i>gus</i>	Tế bào huyền phù/ Bắn gen	Southern và Northern blot	1998	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu phản ứng của <i>ABRC1</i> thuộc promoter của <i>HVA 22</i>
163	Kenfong	McElroy et al. (Cornell University, USA)	Promoter <i>Actin1</i> với gen <i>gus</i>	Tế bào huyền phù và tế bào trần/ Bắn gen và phương pháp trực tiếp	Phân tích hoạt tính <i>GUS</i>	1990	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter <i>Actin 1</i> và khả năng ứng dụng trong biến nạp gen
164	Nipponbare, Taipei309	Zhang et al. (Cornell University, USA)	Promoter <i>Actin1</i> với gen <i>gus</i>	Tế bào trần/ PEG	Phân tích hoạt tính <i>GUS</i>	1991	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của <i>Actin 1</i> promoter trong cây lúa chuyển gen
165	Lemont và Nipponbare	Kyozuka et al. (Plantech Research Institute, Japan)	Promoter Alcohol dehydrogenase 1 (<i>Adhl</i>) từ ngô và gen <i>gus</i>	Tế bào trần/ Điện áp cao	Phân tích hoạt tính <i>GUS</i>	1994	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter <i>Adh 1</i> của ngô
166	Taipei 309	Al-Forkan et al. (University of Nottingham, UK)	Gen <i>gus</i> và <i>hpt</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu biến nạp gen với các giống lúa của Bangladesh

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
167	Nipponbare và Kinuhikari	Zhao et al. (Zhejiang University, China)	Gen <i>cecropin B</i> và <i>bar</i>	?/ Bắn gen	Southern blot	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu biến nạp gene thông qua bắn gen
168	BR26, Binni	Fu et al. (John Innes Centre, UK)	Gen <i>bar</i> , <i>gus</i> và <i>hpt</i>	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu biến nạp gene thông qua bắn gen
169	Taipei309	Mazithulela et al. (John Innes Centre, UK)	Promoter của protein vỏ của virus đường vân ở ngô (MSV) và gen <i>GUS</i>	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter của protein vỏ từ MSV
170	ITA212	Hoa et al. (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Cre và loxP	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu tạo cây chuyển gen sạch bằng cách loại bỏ ADN không cần thiết thông qua việc sử dụng Cre/LoxP

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
171	Taipei 309	Wu et al. (Ventria Bioscience, USA)	Đồng biến nạp chín gen nằm trên chín plasmids khác nhau: <i>Hygromycin phosphotransferase</i> , <i>Glucuronidase</i> , <i>Luciferase</i> , <i>Phosphinothricin acetyltransferase</i> , <i>Alpha-1-antitripsin</i> , <i>Hepatitis B virus surface antigen</i> , <i>Hepatitis C virus envelop protein</i> , <i>Bacillus Subtilisin</i> BPN và protein phát huỳnh quang màu xanh	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Southern và Western blot	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hiệu quả đồng biến nạp nhiều gen
172	Nipponbare	Peng et al. (Purdue University, USA)	Gen <i>neomycin phosphotransferase II</i> và <i>gus</i>	Tế bào trần/?	Southern blot	1995	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hệ thống đồng biến nạp gen trên lúa
173	IR54 and Radon	Cao et al. (Chinese Academy of Sciences, China)	Cre và loxP	Không có thông tin	Không có thông tin	2006	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu tạo cây chuyển gen sạch bằng cách loại bỏ ADN không cần thiết thông qua việc sử dụng Cre

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
174	Taipei309	Miller et al. (Pioneer Hi-Bred International Inc., USA)	Gen <i>bar</i> và <i>gus</i>	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hệ thống đồng biến nạp gen với một plasmid nhị nguyên mang 2 T-ADN
175	ZhongZuo 321, Ariete và Khao Dawk Mali 105	Vain et al. (John Innes Center, UK)	Gen <i>bar</i> , <i>gus</i> , <i>ahpIV</i> và <i>gfp</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và ELISA	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu đồng biến nạp gen từ hai plasmid trên cùng một dòng vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>
176	Hi-II	Afolabi et al. (John Innes Center, UK)	Gen <i>bar</i> , <i>gus</i> , <i>ahpIV</i> và <i>gfp</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và Southern blot	2004	Ruộng thí nghiệm	Nghiên cứu hệ thống biến nạp gen một binary plasmid mang hai T-ADN
177	Nipponbare	Chung et al. (Pusan National University, Korea)	Protein phát huỳnh quang màu xanh từ loài sứa biển <i>Aequorea victoria</i>	Không có thông tin	Không có thông tin	2000		Gen chỉ thị mới có thể quan sát inplanta không cần phá mẫu
178	Nipponbare	Li et al. (Zhongshan University, China)	Promoter của gen <i>beta-1, 3-glucanase isoenzyme GIII</i> từ lúa mạch và gen <i>gus</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern và Northern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter <i>GIII</i> trên lúa
179	DS20, OMCS96, OMCS97, IR64, IR72	Hoa et al., (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Gen <i>hyg</i> và <i>gus</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu khả năng biến nạp của giống lúa trồng tại Việt nam

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
180	Taipei 309	Li et al. (Zhongshan University, China)	Các dạng đột biến khác nhau của promoter β -1,3- <i>glucanase</i> isoenzyme <i>GIIIr</i> từ lúa mạch và gen <i>gus</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern và Northern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của promoter β -1,3- <i>glucanase</i> isoenzyme <i>GIIIr</i> trong quá trình tương tác tăng tính kháng bệnh bằng salicylic acid
182	Zhonghua 8	Sorteberg et al. (Agricultural University of Norway, Norway)	Các dạng đột biến khác nhau của promoter protein vận chuyển lipid (<i>HvLTP2</i>) từ lúa mạch và gen <i>gus</i>	Tế bào trần / Điện áp cao	RT-PCR, Southern và Northern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của <i>HvLTP2</i> trong quá trình tương tác tăng tính kháng bệnh bằng salicylic acid
183	Một Bụi, MTL250	Hoà và Bổng, (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Phosphomannose isomerase (<i>pmi</i>)	Tế bào huyền phù/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2002	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu gen thanh lọc mới
184	Kinuhikari	Endo et al. (Nippon Paper Industries, Japan)	Gen <i>ipt</i> và <i>R recombinase</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR	2002	Phòng thí nghiệm	Hệ thống biến nạp gen sạch (không có selectable marker) dựa trên <i>ipt</i> gen
185	Radon	Jin et al. (Zhejiang University, China)	Gen nhảy <i>Ac/Ds</i> và gen <i>hpt</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Không có thông tin	2003	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu tạo giống lúa biến nạp gen sạch thông qua <i>Ac/Ds</i>

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
186	Nipponbare	Xue et al. (Shandong Agricultural University, China)	Vùng đích kèm thể nhân (<i>MARs</i>) ly trích từ cây thuốc lá (TM2) và gen <i>gus</i> với hai loại promoter <i>35S</i> và <i>Ubiquitin</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern blot và thử nghiệm sinh học cho GUS	2005	Phòng thí nghiệm	Tăng mức độ thể hiện của gen chuyển trong cây biến nạp gen
187	Zhonghua 11	Oh et al. (Myongji University, Korea)	<i>BP-MAR</i> , đoạn 1.3-kb phía trên liền với đầu 5' của <i>MAR</i> trong lysozyme locus của gà	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot và RNA-dot blot	2005	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu vai trò của <i>MAR</i> trong gen biến nạp
188	Nipponbare	Rathore et al. (Purdue Univ, USA)	Gen <i>Phosphinothricin acetyltransferase</i> (<i>bar</i> hay <i>PPT</i>)	Tế bào trần/ PEG	Southern blot	1993	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu ứng dụng <i>bar</i> như gen thanh lọc trong biến nạp gen lúa
189	Nipponbare	Ito et al. (Hokkaido University, Japan)	promoter của gen <i>poxA</i> (Peroxidase) và gen <i>GUS</i>	Tế bào trần/ Điện áp cao	Southern blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính promoter của gen <i>pox A</i>
190	IRAT 349	Digeon et al. (Unit'e de Biochimie et Bio-logie Mol'eculaire des C'ereales, France)	Promoter của gen <i>puroindoline-b</i> và <i>GUS</i>	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR và Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính promoter của gen <i>puroindoline-b</i>
191	Taipei9	Kloti et al. (Institute of Plant Sciences, Switzerland)	Promoter của virus hình que tungro ở lúa và gen <i>GUS</i>	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính promoter của virus tungro ở lúa

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
192	Kitaake	Wu et al. (National Institute for Agrobiological resources, Japan)	Các biến thể khác nhau của promoter <i>Glu-B1</i> với gen <i>GUS</i>	Không có thông tin	Không có thông tin	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của dạng cấu trúc không gian cis của promoter <i>Glu-B1</i>
193	Guangling xiangnuo	Yu et al. (Yangzhou University, China)	Gen <i>Metr</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR	2005	Phòng thí nghiệm	Chuẩn hoá qui trình biến nạp
194	Nipponbare	Kyozuka et al. (Plantech Research Institute, Japan)	Promoter <i>rbcS</i> và gen <i>gus</i>	Tế bào trần/ Điện áp cao	Southern và Northern blot	1993	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter <i>rbcS</i> từ lúa
195	Taipei 309	Cornejo et al. (United States Department of Agriculture, USA)	promoter <i>Ubi</i> từ ngô và gen <i>gus</i>	Tế bào trần/ Không có thông tin	Không có thông tin	1993	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter <i>Ubi</i> trên lúa
196	Tainung 62	Chan et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Promoter của gen α -amylase (α -Amy8) và <i>gus</i>	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	1993	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter của α -amylase (α -Amy8)
197	Tainung 62 và Tainan 5,	Chan et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Promoter α -amylase (α -Amy8) từ lúa và gen <i>gus</i>	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và phân tích hoạt tính của <i>GUS</i>	1994	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu hoạt tính của promoter α -amylase của lúa
198	Nipponbare	Sakamoto et al. (Univ of Tokyo, Japan)	Gen <i>GA 2- oxidase</i> (<i>OsGA2ox1</i>) từ lúa	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot, phân tích GA3	2003	Phòng thí nghiệm	Làm giảm chiều cao cây

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
199	Dongjin, Nakdong, Milyang99, Daesan, Hwayoung, Milayng109, Palgong, Singeumho, Milayng151	Jeon et al. (Pohang Univ of Science and Technology, Korea)	<i>MADS-box</i> từ cây lúa (<i>OsMADS1</i> , <i>OsMADS5</i> , <i>OsMADS6</i> , <i>OsMADS7</i> , <i>OsMADS8</i> , <i>OsMADS14</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và quan sát dạng hình	2000	Nhà lưới	Cải thiện cao cây và thời gian sinh trưởng
200	Norin8	Hayama et al. (Nara Institute of Science and Technology, Japan)	Antisense của gen <i>OsGI</i> từ cây lúa, gen <i>orthologue</i> của <i>Arabidopsis</i> GIGANTEA (GI)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, phân tích mRNA bằng phương pháp Rnase protection assay	2003	Nhà lưới	Rút ngắn thời gian sinh trưởng
201	Taipei 309	He et al. (Salk Institute for Biological Studies, USA)	Gen điều khiển hoa giống lá từ <i>Arabidopsis thaliana</i>	Mô sẹo/ Bản gen	PCR, Northern blot	2000	Nhà lưới	Rút ngắn thời gian sinh trưởng
202	Wuxiangjin ⁹	Liu et al. (Yangzhou University, China)	Gen <i>Ferritin</i> từ đậu <i>Phaseolus limensis</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern và Northern blot	2004	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu sắt
203	Taipei 309	Bellaloui et al. (California State Univ, USA)	Gen <i>Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (s6pdh)</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot, và thử nghiệm sinh học	2003	Nhà lưới	Tăng khả năng di động của Bo trong mạch libe của lúa
204	IR68144-3B-2-2-3	Vasconcelos et al. (IRRI, Phillippines)	Gen <i>Ferritin</i> từ cây đậu tương	?/ Bản gen	PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng sắt và kẽm trong hạt gạo

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
205	Taipei 309	Blilou et al. (Estacion Experimental del Zaidin, Spain)	Gen vận chuyển Lipít 1 (<i>ltp 1</i>)	Tế bào trần/ Điện áp cao	RT-PCR và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu mối liên hệ giữa sự thể hiện của <i>ltp1</i> và quá trình hình thành <i>mycorrhiza</i> trong vùng rễ
206	Zhonghua 10	Sun et al. (Chinese Academy of Agricultural Sciences, China)	Gen <i>Glutamine synthetase</i> (<i>GS1</i> và <i>GS2</i>) từ vi khuẩn	?/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern và Northern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa có khả năng hấp thu và sử dụng đạm hiệu quả
207	Taipei 309	Dey et al.. (IRRI, Philippines)	Gen <i>Nodulin</i> (<i>Enod40</i>) từ cây họ đậu	Phôi non /Bắn gen	Southern blot, RT-PCR	2004	Nhà lưới	Tạo khả năng hình thành nốt sần của vi khuẩn cố định đạm trên lúa
208	Taipei 309	Dey et al.. (IRRI, Philippines)	Protein có gắn nhân tố Nod từ đậu tương	Phôi non/ Bắn gen	Southern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Tạo khả năng cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm trên lúa
209	Murasaki	Sreevidya et al. (IRRI, Philippines)	Gen Lectin (<i>psl</i>) từ đậu Hà lan (<i>Pisium sativum</i>) và <i>Lectin-nucleotide phosphohydrolase</i> (<i>gs52</i>) từ giống đậu hoang dại (<i>Glycine soja</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo khả năng cộng sinh của vi khuẩn cố định đạm trên lúa

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
210	Taipei 309	Schunmann et al. (Graingene, Australia)	Promoter của hai gen vận chuyển phosphate từ lúa mạch điều khiển gen <i>gus</i> hoặc <i>gfp</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu chức năng của promoter điều khiển quá trình hấp thu lân
211	Nipponbare	Yi et al. (Zhejiang University, China)	Gen <i>OsPTF1</i> (Transcription factor) từ lúa	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	-	2005	Phòng thí nghiệm	Cải thiện tính hấp thu phosphate trong môi trường nghèo lân
212	Kitaake	Goto et al. (Central Research Institute Electric Power Industry, Japan)	Gen <i>Ferritin</i> từ cây đậu tương	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Nhà lưới	Tăng hàm lượng sắt dễ tiêu trong hạt gạo
213	Tsukinohikari	Takahashi et al. (Univ of Tokyo, Japan)	Gen <i>Nicotianamine aminotransferase</i> (<i>naatA</i> và <i>naatB</i>) từ lúa mạch	Mô sẹo / <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2001	Nhà lưới	Tăng khả năng hấp thụ sắt trong điều kiện đất kiềm
214	Notohikari	Wakita et al. (Ishikawa Agricultural College, Japan)	Gen bão hoà axit béo (<i>NtFAD3</i>) từ cây thuốc lá	Mô sẹo/ Bắn gen	Southern, Northern blot và phân tích hoá học	1998	Phòng thí nghiệm	Cải thiện thành phần axit béo trong hạt
215	Kitaake	Qu et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Gen <i>Ferritin subunit I</i> cADN của đậu tương (<i>SoyferH-1</i>)	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern và Western blot	2005	Nhà lưới	Cải thiện hàm lượng sắt trong hạt gạo

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
216	Taipei 309	Lucca et al. (Institute for Plant Science, Switzerland)	Gen <i>Ferritin</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern và Western blot	2002	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu sắt
217	M12	Drakakaki et al. (John Innes Centre, UK)	Gen <i>Ferritin</i> từ đậu tương (<i>Glycine max</i>)	Phôi non/ Bản gen	Southern, Northern và Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu sắt
218	Taipei 309	Nandi et al. (Applied Physiologics, USA)	Gen <i>Lactoferrin</i> (<i>hlf</i>) từ người	?/ Vi tiêm	Southern, Western blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng lactoferrin trong hạt
219	Taipei310	Islam et al. (CSIRO Entomology, Australia)	Gen <i>Albumin</i> từ cây hướng dương	?/ Vi tiêm	PCR và điện di protein	2005	Phòng thí nghiệm	Cải thiện hàm lượng sulfur trong hạt gạo
220	Matsuyama-mii	Momma et al. (Kyoto University, Japan)	Gen <i>Glycinin</i> (<i>AlaB1b</i>) từ đậu tương	Không có thông tin	SDS-PAGE và Western blot	1999	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu glycinin
221	Taipei 309	Suzuki et al. (UC Davis, USA)	Gen <i>Lactoferrin</i> (<i>rHLf</i>) từ người	Mô sẹo/ Bản gen	Ly trích lactoferrin từ dung dịch huyền phù chuyển gen	2003	Phòng thí nghiệm	Tổng hợp lactoferrin
222	Nipponbare	Zheng et al. (Louisiana State University, USA)	β -phaseolin từ <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Tế bào trần/ PEG	Southern và Western blot	1995	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu lysine (β -phaseolin)
223	Taipei 309	Hagan et al. (CSIRO Plant Industry, Australia)	Gen albumin của hạt (<i>SSA</i>) từ cây mè	?/ Bản gen	Northern và phân tích hóa 1 học	2003	Phòng thí nghiệm	Tăng protein giàu lưu huỳnh

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
224	Matsuyama-mii	Katsube et al. (Kyoto Univ, Japan)	<i>Glycinin (AlaB1b)</i> từ đậu tương	Tế bào trần/ Điện áp cao và <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm	Tăng protein giàu lưu huỳnh trong hạt
225	Taipei 309	Wu et al. (Missouri Univ, USA)	Gen mã hoá cho <i>tRNA(lys)</i> đã bị biến đổi	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Western và phân tích hoá học	2003	Phòng thí nghiệm	Tăng protein giàu lysine
226	Nipponbare	Tozawa et al. (National Agriculture Research Center, Japan)	Gen mã hoá cho <i>anthranilate synthase</i> đã bị biến đổi (<i>OASAI-D323N</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng tryptophan
227	Taipei9	Burkhardt et al. (Institute for Plant Sciences, Switzerland)	Gen <i>Phytoen synthase</i> từ cây thủy tiên hoa vàng (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>)	Phôi non/ Bắn gen	RT-PCR, Southern và Western blot	1997	Phòng thí nghiệm	Tăng hàm lượng phytoene, tiền chất cho provitamine A, trong hạt gạo
228	BR28, BR29 và IR86144	Parkhi et al. (IRRI, Philippines)	Gen <i>Phytoen synthase (psy)</i> từ ngô, <i>carotene desaturase (crtI)</i> từ <i>Erwinia uredovora</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và Southern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu Vit A nhưng không chứa gen thanh lọc

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
229	Taipei 309	Beyer et al. (Univ of Freiburg, Germany)	Các gen mã hoá cho các enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp Pro-vitamine A (<i>psy</i> , <i>lcy</i> và <i>crtI</i>)	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot và phân tích hoá học	2002	Phòng thí nghiệm	Tổng hợp pro-vitamine A
230	IR64, MTL250, Taipei 309	Hoa et al. (Swiss Federal Institute of Technology, Switzerland)	Các gen mã hoá cho các enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp Pro-vitamine A (<i>psy</i> và <i>crtI</i>)	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Southern blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Tổng hợp pro-vitamine A
231	Taipei 309	Ye et al. (Swiss Federal Institute of Technology, Switzerland)	Các gen mã hoá cho các enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp Pro-vitamine A (<i>psy</i> và <i>crtI</i>)	Phôi non/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot và phân tích hoá học	2000	Phòng thí nghiệm	Tổng hợp pro-vitamine A
232	Asanohikari	Paine et al. (Sygenta)	Gen <i>Phytoene synthase</i> (<i>psy</i>) từ ngô, <i>carotene desaturase</i> (<i>crtI</i>) từ <i>Erwinia uredovora</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và phân tích hàm lượng beta-carotenoid	2005	Nhà lưới	Tăng hàm lượng beta-carotene trong hạt gạo
233	Taipei309	Hoa et al. (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Gen <i>phosphomannose isomerase</i> , <i>phytoene synthase</i> và <i>crtI-syntheti-</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2005	Nhà lưới	Tăng hàm lượng beta-carotene trong hạt gạo

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
			<i>cphytoene desaturase</i>					
234	IR64, Taipei309	Hoa et al. (Cuulong Delta Rice Research Institute, Vietnam)	Gen <i>phytoene synthase</i> và <i>crtI-synthetic-phytoene desaturase</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern blot	2003	Nhà lưới	Tăng hàm lượng γ -oryzanol và β -carotene trong hạt gạo
235	Tainung 67	Huang et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Gen albumin huyết thanh (<i>Has</i>) từ người	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	ADN, RNA và protein blot	2005	Phòng thí nghiệm	Sản xuất serum albumin trong dung dịch huyền phù của lúa
236	Sasanishiki, Yamahoshi	Okada et al. (Tohoku Univ, Japan)	<i>Cry j I</i> - Gen gây dị ứng phần hoa cây tuyết tùng Nhật Bản	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Western blot và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Sản xuất chất dị ứng nguyên do hạt phần của cây tuyết tùng Nhật Bản
237	Bengal	Torres et al. (John Innes Center, UK)	ADN mã hoá cho mạch đơn (<i>scFvT84.66</i>)	Mô sẹo/ Bắn gen	Southern và Northern blot	1999	Phòng thí nghiệm	Sản xuất chất kháng thể chống lại carcino-embryonic antigen (<i>scFvT84.66</i>)
238	Kitaake	Yasuda et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Gen <i>GLP-1</i> (Glucagon-like peptide 1)	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR và Western blot	2005	Phòng thí nghiệm	Tạo giống lúa giàu glucagon dùng điều trị bệnh tiểu đường

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
239	93VA	Panahi et al. (National Research Concil of Canada, Canada)	Nhân tố kích thích sinh trưởng giống như Insulin (<i>hIGF-I</i>) từ người	Mô sẹo/ <i>Agrobac-</i> <i>terium</i>	PCR, RT-PCR, Southern, Western blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Sản xuất <i>hIGF-I</i>
240	Tainung6 7	Chen et al. (Academia Sinica, Taiwan)	Gen Interferon- gamma (<i>IFN-γ</i>)	Mô sẹo/ <i>Agrobac-</i> <i>terium</i>	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Sản xuất interferon-gamma cho ngành dược
241	Koshihika ri	Fujiyama et al.. (Osaka Univ, Japan)	Gen Lactoferin từ người	?/ Bắn gen	Thử nghiệm sinh học	2004	Nhà lưới và phòng thí nghiệm	Sản xuất lactoferin
242	Taipei 309	Huang et al. (Ventria Bio- science, USA)	Lysozyme (<i>Hls</i>) từ người	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Southern, phân tích protein và thử nghiệm sinh học	2002	Nhà lưới	Sản xuất lysozyme
243	Taipei 309	Huang et al.. (Applied Phytologics, USA)	Lysozyme (<i>Hls</i>) từ người	Mô sẹo/ Bắn gen	Western blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Sản xuất lysozyme
244	Taipei 309	Yang et al. (Applied Phytologics Inc, USA)	Lysozyme (<i>Hls</i>) từ người	Mô sẹo/ <i>Agrobac-</i> <i>terium</i>	PCR, Western blot và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Tổng hợp lysozyme trong lúa
245	Taipei 309	Yang et al. (Ventria Bioscience, USA)	Lysozyme (<i>Hls</i>) từ người	?/ Vi tiêm	Quan sát kính hiển vi và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm	Sản xuất lysozyme trong hạt
246	Taipei309	Hennegan et al. (Ventria Bioscience,USA)	Promoter <i>Puroindo-</i> <i>line b</i> , đoạn peptit tín hiệu (<i>Tapur</i>) và	?/ Vi tiêm	Southern, và Western blot	2005	Phòng thí nghiệm	Sản xuất lysozyme

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
			lysozyme từ người					
247	Taipei 309	Terashima et al. (Osaka Prefecture Univ, Japan)	Gen <i>alpha 1-antitrypsin</i> từ người	Không có thông tin	Không có thông tin	2002	Phòng thí nghiệm	Sản xuất protein tái tổ hợp
248	Kinuhikari	Tada et al. (Nagoya University, Japan)	Antisense của 16 kDa chất gây dị ứng (<i>RA17</i>) từ lúa	Tế bào trần/ Điện áp cao	Southern, Northern blot, SDS-PAGE và ELISA	1996	Phòng thí nghiệm	Giảm hàm lượng chất gây dị ứng (<i>RA17</i>) trong hạt gạo
249	EYI105	Claparols et al.. (Instituto de Biologia Molecular de Barcelona, Spain)	Gen Transglutaminase từ chuột (<i>rTGp</i> -gen vận chuyển glutaminase từ tuyến tiền liệt của chuột)	Phôi chín/ Bắn gen	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Sản xuất transglutaminase
250	Kitaake	Takagi et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Các epitô của tế bào T của <i>Cry j I</i> và <i>II</i>	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern và Northern blot	2005	Phòng thí nghiệm	Sản xuất vacxin trong hạt gạo
251	Wuyungen 7, Wuyungen 8, Zhengxiang 24 và Longtefu B	Liu et al. (Yangzhou Univ, China)	Đoạn antisense 756 bp của gen <i>Wx</i> từ lúa nằm giữa exon 6 và 9	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2003	Ruộng	Giảm hàm lượng amylose trong hạt gạo
252	M202	Krishnamurthy (Montana State Univ, USA)	Gen <i>Puroindoline</i> (<i>pinA</i> và <i>pinB</i>) từ lúa mì	Mô sẹo/ Bắn gen	PCR, Southern, Northern, Western blot, ELISA và thử nghiệm sinh học	2001	Phòng thí nghiệm	Tăng độ mềm của hạt

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
253	Nakdong	Kim et al. (Myong Ji Univ, Korea)	Gen sản xuất Glycogen (<i>glgB</i>) từ <i>E.coli</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2005	Phòng thí nghiệm	Tăng mức độ phân nhánh của amylopectin trong hạt
254	Nakdong	Kong et al. (Kyungpook National Univ, Korea)	Gen <i>Phytochrome A</i> (<i>phyA</i>) từ cây <i>Arabidopsis thaliana</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Western blot và thử nghiệm sinh học	2004	Ruộng	Cải thiện dạng hình và năng suất
255	Kitaake	Jiao et al. (Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, China)	NADP-malic enzyme (<i>ME</i>) từ lúa và gen <i>phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (<i>PC</i>), <i>pyruvate, orthophosphate dikinase</i> (<i>PK</i>), và <i>PC+PK</i> (<i>CK</i>) từ ngô	Không có thông tin	Không có thông tin	2002	Phòng thí nghiệm	Cải thiện quang hợp của cây
256	Zhonghua 11	Jin et al. (Zhejiang Univ, China)	Antisense của <i>Rubisco activase</i> (<i>RCA</i>)	?/ <i>Agrobacterium</i>	Không có thông tin	2004	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu ảnh hưởng của việc giảm hoạt tính <i>Rubisco activase</i> lên <i>Rubisco</i> và quang hợp
257	Kitaake	Agarie et al. (Saga Univ, Japan)	Gen <i>Phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (<i>pepc</i>) từ ngô	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Thử nghiệm sinh học	2002	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng quang hợp
258	Kinuhikar	Takeuchi et al. (Mitsui Chemicals, Inc., Japan)	<i>NADP-dependent malic enzyme</i> (<i>NADP-ME</i>) từ ngô	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Northern, Western blot, và các thử nghiệm sinh học	2000	Nhà lưới	Tăng khả năng quang hợp

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp /Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
259	Kitaake	Fukayama et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)</i> từ ngô	Không có thông tin	Không có thông tin	2003	Phòng thí nghiệm	Cải thiện quang hợp của cây
260	Kitaake	Fukayama et al. (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan)	Gen <i>C4-Specific Pyruvate, Orthophosphate Dikinase (C4-Pdk)</i> từ ngô	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	RT-PCR, southern, Northern blot và SDS-PAGE	2001	Phòng thí nghiệm	Cải thiện quang hợp của cây
261	Tsukinohi kari	Suzuki et al. (Japan Tobacco Inc., Japan)	Gen <i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK)</i> từ cây C4 <i>Urochloa panicoides</i>	Tế bào trần/ Điện áp cao	Western blot	2000	Phòng thí nghiệm	Nghiên cứu biến nạp enzyme tham gia quá trình quang hợp của cây C4 vào lúa
262	Kitaake, Nipponbare	Ku et al. (Washington State Univ, USA)	<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase (pepc)</i> từ ngô	?/ <i>Agrobacterium</i>	Southern, Northern, Western blot và thử nghiệm sinh học	1999	Phòng thí nghiệm	Tăng khả năng quang hợp
263	Notohikari	Makino et al. (Tohoku Univ, Japan)	Đoạn Antisense của <i>rbcS</i> (Rubisco small subunit) từ lúa	?/ Bắn gen	Ly trích Rubisco và thử nghiệm sinh học	2000	Phòng thí nghiệm	Cải thiện năng suất và hiệu quả sử dụng đạm trong điều kiện nồng độ CO2 trong môi trường cao
264	Taipei 309	Lunn et al. (CSIRO Plant Industry, Australia)	Gen <i>sps</i> (Sucrose-phosphate synthase) từ <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> sp.	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	Ly trích SPS và thử nghiệm sinh học	2003	Phòng thí nghiệm và nhà lưới	Cải thiện năng suất

TT	Tên giống	Tác giả/ Cơ quan	Gen/Vector	Mô sử dụng/ Phương pháp	Phương pháp xét nghiệm	Năm biến nạp/ Phóng thích	Hiện trạng	Ứng dụng
265	Kitaake	Sakulsingharoj (Washington State Univ, USA)	Gen <i>glgC</i> -TM từ <i>E. coli</i>	Mô sẹo/ <i>Agrobacterium</i>	PCR, Northern blot và thử nghiệm sinh học	2004	Phòng thí nghiệm	Tăng trọng lượng hạt

PHỤ LỤC D: DANH SÁCH CÁC SẢN PHẨM CHUYỂN GEN ĐÃ ĐƯỢC ĐÁNH GIÁ AN TOÀN
 Department of Food Safety, MHLW
 As of 12 Apr 2007

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
Khoai tây (8)	New Leaf Potato Bt6	Kháng sâu	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	New Leaf Potato SPBT02- 05	Kháng sâu	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	New Leaf Plus Potato RBMT21-129	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	14/9/2001
	New Leaf Plus Potato RBMT21-350	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	14/9/2001
	New Leaf Plus Potato RBMT22-82	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	14/9/2001
	New Leaf Plus Potato SEMT15-101	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	6/5/2001
	New Leaf Y Potato SEMT15-15	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	6/5/2001
	New Leaf Y Potato SEMT15-02	Kháng sâu Kháng virus	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
Đậu tương (4)	Đậu tương Roundup Ready 40-3-2	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	260-05	Hàm lượng axit Oleic cao	DuPont K.K.	Optimum Quality Grain LLC (USA)	30/3/2001
	A2704-12	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer CropScience Ltd.	Bayer CropScient (Germany)	8/7/2001
	A5547-127	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer CropScience	Bayer CropScient (Germany)	8/7/2001

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
			Ltd.		
Củ cải đường (3)	T120-7	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer CropScience Ltd.	Bayer CropScient (Germany)	30/3/2001
	Củ cải đường Roundup Ready 77	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA) Syn-genta seeds AG (Switzerland)	5/6/2003
	Củ cải đường Roundup Ready H7-1	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Mosanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA) KWs Saat AG (Germany)	30/6/2003
Ngô (26)	Bt11	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Syngenta Seed K.K	Syngenta Seeds AG (Switzerland)	30/3/2001
	Dòng 176	Kháng sâu	Syngenta Seed K.K	Syngenta Seeds AG (Switzerland)	30/3/2001
	MON810	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	T25	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer CropScient Ltd	Bayer CropScient (Germany)	30/3/2001
	DLL25	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	DBT418	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	Ngô Roundup Ready GA21	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	Ngô Roundup Ready NK603	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	T14	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer CropScient Ltd	Bayer CropScient (Germany)	30/3/2001
	Ngô ngọt BT11	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Syngenta Seed K.K	Syngenta Seeds AG (Switzerland)	30/3/2001
	MON863	Kháng sâu	Monsanto	Mosanto Company (USA)	21/2/2002

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
			Japan Ltd.		
	Dòng ngô1507	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Pioneer Hi-Bred International Inc. Mycogen Seeds/Dow AgroSciences LLC(USA)	8/7/2002
	Dòng Ngô Roundup Ready NK603	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/6/2003
	Dòng Ngô Roundup Ready GA21X Mon810	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/6/2003
	Dòng Ngô Roundup Ready NK603 X MON810	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/6/2003
	Dòng T25X MON810	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Optimum Quality Grains LLC (USA)	30/6/2003
	Dòng 1507 X Ngô Roundup Ready NK603	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Dow AgroSciences LLC/ Pioneer Hi-Bred International Inc (USA)	3/3/2004
	Dòng MON810 X MON863	Kháng sâu	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	3/3/2004
	Dòng Mon 863X MON810X Ngô Roundup Ready NK603	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	5/10/2004
	B.t Cry34/35Ab1 Dòng DAS-59122-7	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Dow AgroSciences LLC/ Pioneer Hi-Bred International Inc (USA)	25/10/2005
	MON88017	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	25/10/2005
	MON88017X MON810	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	10/11/2005
	Dòng 1507X B.t Cry34/35Ab1 Dòng DAS-59122-7	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Dow AgroSciences LLC/ Pioneer Hi-Bred International Inc (USA)	15/12/2005
	Dòng B.t Cry34/35Ab1 Dòng DAS-59122-7X NK603	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Dow AgroSciences LLC/ Pioneer Hi-Bred International Inc (USA)	15/12/2005
	Dòng B.t Cry34/35Ab1 Dòng DAS-59122-7X 1507X NK603	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	DuPont K.K	Dow AgroSciences LLC/ Pioneer Hi-Bred International Inc (USA)	15/12/2005

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
	LY038	Hàm lượng lysine cao	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	12/4/2005
Cải dầu (15)	Cải dầu Roundup ready RT73	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	HCN92	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	PGS1	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	PHY14	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	PHY35	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	PGS2	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	PHY36	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	T45	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	MS8RF3	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	HCN10	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	MS8	Chống chịu thuốc trừ cỏ; Bất dục đực	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	RF3	Chống chịu thuốc trừ cỏ; Phục hồi tính bất dục đực	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	WESTAR-Oxy-235	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
	PHY23	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Crop-Sciences Ltd	Bayer CropSciences (Germany)	30/3/2001
	Cải dầu Roundup ready 1445	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	14/9/2001
Cỏ linh lăng (3)	J101	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	10/14/2005
	J163	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	10/14/2005
	Dòng J101 X J163	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	10/14/2005
Bông (18)	Bông Roundup ready 1445	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	Bông BXN 10211	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Stoneville Pedigreed Seed	Stoneville Pedigreed Seed (USA)	30/3/2001
	Bông BXN 10222	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Stoneville Pedigreed Seed	Stoneville Pedigreed Seed (USA)	30/3/2001
	Bông Ingard 531	Insect resistance	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	Bông Ingard 757	Insect resistance	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/3/2001
	Bông BXN 10215	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Stoneville Pedigreed Seed	Stoneville Pedigreed Seed (USA)	30/3/2001
	15985	Kháng sâu	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	10/1/2001
	Dòng Roundup Ready Cotton1445X Bông Ingard 531	Kháng sâu; Chống	Monsanto	Mosanto Company (USA)	30/6/2003

Cây trồng	Dòng	Tính trạng	Nơi nộp đơn	Nơi sản xuất	Thời điểm hoàn thành
		chịu thuốc trừ cỏ	Japan Ltd.		
	Dòng 15985 X Bông Roundup ready 1445	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	30/6/2003
	LLCotton25	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Cropscience Ltd.	Bayer CropSciences (Germany)	6/28/2004
	MON88913	Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	4/7/2005
	MON88913X 15985	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Monsanto Japan Ltd.	Mosanto Company (USA)	4/7/2005
	281	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Mycogen Seeds/ Dow AgroScience LLC (USA)	9/5/2005
	3006	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Mycogen Seeds/ Dow AgroScience LLC (USA)	9/5/2005
	Dòng 281X 3006	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Mycogen Seeds/ Dow AgroScience LLC (USA)	10/6/2005
	Dòng 281X 3006X 1445	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Mycogen Seeds/ Dow AgroScience LLC (USA)	1/110/2006
	Dòng 281 X 3006X MON88913	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Dow Chemical Japan Ltd	Mycogen Seeds/ Dow AgroScience LLC (USA)	2/14/2006
	Dòng LLCotton25 X 15985	Kháng sâu; Chống chịu thuốc trừ cỏ	Bayer Cropscience Ltd.	Bayer CropSciences (Germany)	8/15/2006

PHỤ LỤC E: CÁC DÒNG VI SINH VẬT ĐÃ CHUYỂN GEN TRÊN THỂ GIỚI

TT	Tên chủng	Gen chuyển vào	Ứng dụng
1.	<i>E.coli</i> DH 5alpha	todC1	Phân huỷ TCE
2.	<i>E.coli</i> JM109	bhpA1,bhpA2	Phân huỷ TCE
		BDNF	Tăng cường khả năng biệt hoá và sống sót của tế bào thần kinh
3.	<i>E.coli</i> CC118	todC1	Phân huỷ TCE
4.	<i>E.coli</i> BL21	Gen mã hoá HMK killer toxin	Kháng nấm
		B2M	Làm chỉ thị phân tử chuẩn đoán khối u
5.	<i>E.coli</i> MM294 và MC1061	Tab3	Kích thích sự hình thành và thành thực của tế bào T
6.	<i>E.coli</i> HB101 hoặc DH5 alpha	IL4	Kích thích sự hình thành và thành thực của tế bào T,B
7.	<i>E.coli</i> W 3110	IGF1	Nâng cao hoạt lực của học môn sinh trưởng
8.	<i>E.coli</i> K-12	Phe A	Phân huỷ TCE
		IL8	Cảm ứng gắn kết bạch cầu
9.	<i>E.coli</i> MG1655	Phe A	Phân huỷ TCE
10.	<i>E.coli</i> NBRP	Phe A	Phân huỷ TCE
11.	<i>E.coli</i> DS2,DS2-2	Lin A	Phân huỷ sinh học Lindane
12.	<i>E.coli</i> BAC6010	atzA	Khử gốc Cl ⁻ của atrazine thành hydroxyatrazine
13.	<i>E.coli</i> tuýp 55	IL15	Kích thích sự phát triển của tế bào T,B
14.	<i>E.coli</i> M15	IFNG	Kháng virút

15.	<i>E.coli</i> IKB1	KIR2DS4	Nhận biết phức hợp MHC
16.	<i>E.coli</i> O55B5	IL1B	Cảm ứng phân giải oxit nitric
17.	<i>E.coli</i> BJ5183	P53	Trị liệu gen bằng <i>Adenovirut</i> tái tổ hợp trong chữa trị ung thư suy giảm p53
18.	<i>Pseudomonas paueimobilis</i>	Lin A	Phân huỷ sinh học Lindane
19.	<i>Pseudomonas</i> ppY101LA	linA	Phân huỷ sinh học Lindane
20.	<i>Pseudomonas peusodoalcaligens</i>	atzA,atzB,atzC	Phân huỷ sinh học Lindane
21.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain	Bhp và tod	Phân huỷ sinh học PCB
22.	<i>Pseudomonas cepa-cia</i> G4 5223PR1	Toluene monooxygenaza	Phân huỷ sinh học TCE
23.	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Bhp	Phân huỷ sinh học PCB
24.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113pcb	Tn PCB	Phân huỷ sinh học PCB
25.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	Bhp	Phân huỷ sinh học PCB
26.	<i>Pseudomonas</i> spB13 FR1	Bhp	Phân huỷ sinh học PCB
27.	<i>Pseudomonas putida</i> pp0301	pR0301 plasmid	Khoáng hoá phenoxyacetate
28.	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> IGP4	Bhp ABC	Phân huỷ sinh học PCB
29.	<i>Adenovirus</i> tuýp 5 nhóm C	Gen ức chế khối u dạng đại p53	Trị liệu gen bằng <i>Adenovirut</i> tái tổ hợp trong chữa trị ung thư suy giảm p53
30.	Virus làm suy giảm bệnh đậu mùa dồng	Trình tự mã hoá cho IL-2 và kháng	Chữa ung thư vú di căn và ung thư biểu bì tế bào thận di căn

	<i>Ankara</i>	nguyên MUC	
31.	Loài <i>Salmonella enterica</i> dòng <i>Dublin</i> và dòng <i>Typhimurium</i>	Loại bỏ 2 gen <i>ssaC</i> và gen <i>ssaT</i> ở <i>Salmonella enterica</i>	Sản xuất vacxin
32.	Loài <i>Pichia pastoris</i> dòng GS115	Cecropin D	Dùng làm thuốc kháng khuẩn
33.	Loài <i>Bacillus</i> dòng 168	Nhóm 11 gen	Sinh tổng hợp Nisin
34.	Loài <i>Ralstonia solanacearum</i> dòng GMI8172	Gen <i>HrpO</i>	Sinh bacteriocin sử dụng trong phòng chống bệnh héo xanh cà chua.
35.	<i>Ralstonia solanacearum</i> YN5	pNP126 mang operon <i>lux</i> CDABE của <i>Vibrio fischeri</i> và một vùng promoter nhận được từ genomic ADN của <i>Burkholderia glumae</i>	Nghiên cứu cơ chế gây bệnh héo xanh ở cà chua
36.	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> dòng BR11281	Gen <i>Cry</i> của <i>Bacillus thuringiensis</i>	Phòng trừ sâu hại mía đường
37.	<i>Comamonas testosteroni</i> VP44	Plasmid pE43 (mã hoá cho gen <i>oxy-genolytic orthode-chlorination ohb</i>) hoặc plasmid pPC3 (mã hoá cho gen <i>hydrolytic parade-chlorination fcb</i>)	Khử gốc Cl ⁻ và khoáng hoá toàn bộ monochlorobiphenyls thay thế vị trí ortho và para

PHỤ LỤC F: MỘT SỐ WEBSITE VỀ GMOs

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/outcome_gmo_en.html <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/1999/2-15-1999/btcornandsr.html>

http://pgeu.biotec.or.th/our_products.htm

<http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/hotmaize.html>

<http://www.agbioforum.org/v7n3/v7n3a01-morse.htm>

<http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/references.html#Dalton>

http://www.krishnaworld.com/html/New_research1.html

[http://64.26.172.90/unl2/dbase.php?action=ShowProd&data=BT11+\(X4334CBR%2C+X4734CBR\)&format=LONG](http://64.26.172.90/unl2/dbase.php?action=ShowProd&data=BT11+(X4334CBR%2C+X4734CBR)&format=LONG)

<http://www.atcc.org/Products/vectors.cfm>

<http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/index.shtml>

<http://www.nature.com/ja02>

<http://www.plantphys.net/article.php?ch=21&id=216>

http://www.bdbiosciences.com/nvCategory.jsp?action=SELECT&form=formTree_catBean&item=111944

<http://home.rda.go.kr/eng/report/list2.asp>

<http://www.iab.ac.ru>

http://www.pbs.org/wgbh/harvest/engineer/transgen_lo.html

<http://www.invivogen.com/plasmids/plasmids.htm>

<http://www.promega.com/applications/plant/>

http://www.biotechnology.gov.au/biotechnologyOnline/food/food_and_agriculture.htm

<http://www.wjgnet.com/>
<http://www.micronet.cn/journal/CJB/cat-10-3.htm>
<http://www.abbs.info/menu/menu37-02.htm>
<http://www.asiabionet.org>
<http://www.hcmier.edu.vn>
<http://www.economia.uniroma2.it/conferenze/icabr2005/2004ConfPapers.asp>
<http://www.gendatabaseonline.com/dspMainPage.asp?>
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/index.htm#choice>
<http://www.indsp.org/VIP3A.php>
<http://www.i-sis.org.uk/NGMTLOOF.php>
<http://bio.argon.acad.bg/labgen/Bacillus.html>
<http://biotechknowledge.com./> http://www.icac.org/icac/cotton_info/tis/biotech/documents/
<http://www.bios.net/daisy/bios/392>
<http://www.checkbiotech.org/root/index.cfm>
<http://www.uky.edu/Ag/Entomology/entfacts/fldcrops/ef147.htm>
<http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC7055.html>
<http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/>
<http://www.defra.gov.uk/environment/gm/crops/index.htm>
<http://www.defra.gov.uk/environment/gm/background/index.htm>
<http://www.ccst.us>

<http://www.isaaa.org/>
<https://www.aginternetnetwork.net/>
<http://www.agbiotech.com.vn/vn/>
<http://biosafety.ihe.be/>
<http://genetics.biol.ttu.edu/geneexp.html>
<http://www.ncbe.reading.ac.uk>
<http://www.agbios.com/main.php>
<http://www.croplife.org/>
<http://doegenomes.org/>
<http://www.plantbio.ohiou.edu/epb/instruct/PBIO%20427/>
<http://www.bioplanet.com/planetforums/>
http://www.ebiotrade.com/emagazine/index_5.aspx
<http://www.genomics.com.cn/index.jsp>
<http://www.kuleuven.ac.be/regamvr/files/bioinfv64.htm> (hay)
<http://nar.oupjournals.org/content/vol31/issue1/index.shtml>
http://nar.oupjournals.org/content/vol32/suppl_2/index.shtml
<http://us.expasy.org/tools/peptidecutter/>
<http://www.prettybio.com/upload/NOC.zip>
<http://www.biosino.org/ubb/Forum2/HTML/000302.html>
<http://noc.ibp.ac.cn/>

FTP/Biosoftware/Primer Express 2.0

<http://www.bioloover.com/dvbbs/dispbbs.asp?boardID=11&ID=2995>

<http://www.bioloover.com/>

<http://bioinformers.ebi.ac.uk/newsle...mitoprotii.html>

<http://www.inra.fr/Internet/Produits/Predotar>

<http://www.animalbiotechnology.org/references.asp>

<http://www.und.nodak.edu/misc/ndrural/Sustain%20Development.htm> (GMOs)

<http://www.biotechknowledge.monsanto.com/biotech/bbasics.nsf/gene-trans.html>

<http://ejb.ucv.cl/content/vol6/issue1/full/4/index.html>

<http://www.arc.agric.za/main/biotech.htm>

<http://www.nwrae.org/modules.php?op=modload&name=News&file=index&catid=&topic=5>

<http://www.animalbiotechnology.org/references.asp>

Một số địa chỉ có phần mềm về plasmid:

http://www.premierbiosoft.com/plasmid_maps...sv/cloning.html

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

http://www.premierbiosoft.com/plasmid_maps...sv/cloning.html

<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/ne...etprlaunch.html>

❑❑A CH❑ PROTOCOL ONLINE

<http://www.protocol-online.org/>

<http://www.bioexchange.com/tools/protocols.cfm>

Địa chỉ trang web có phần mềm kiểm tra vị trí cắt giới hạn DNA:

http://www.protocol-online.org/prot/Resear...ction_Digestion

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

<http://www.restrictionmapper.org>

<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>

http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/download.htm

<http://molbiol-tools.ca/>

Tài liệu dạng báo khoa học, ebook... các trang web như

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

HIGHWIRE: <http://highwire.stanford.edu/>

SCIENCEDIRECT: <http://www.sciencedirect.com>

GOOGLE: <http://www.google.com>

GOOGLE SCHOLAR: <http://scholar.goolge.com>

NATURE: <http://www.nature.com>

SCIENCE MAG: <http://www.sciencemag.org>

CELL: <http://www.cell.com>

Thuật ngữ sinh học

<http://cancerweb.ncl.ac.uk/omd/>

PHỤ LỤC G: MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ HỘI THẢO KHOA HỌC “CƠ SỞ DỮ LIỆU SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN VÀ QUẢN LÝ AN TOÀN SINH HỌC”- HÀ NỘI, 19/12/2006





