Kết quả nghiên cứu tạo cây khoai lang kháng bọ hà thông qua công nghệ gen

Phạm Bích Ngọc[1*], Lê Trần Bình[1], Vũ Thị Lan[1, 2], Chu Hoàng Hà[1]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam*

[2]*Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên*

Ngày nhận bài 22.7.2015, ngày chuyển phản biện 25.7.2015, ngày nhận phản biện 20.8.2015, ngày chấp nhận đăng 24.8.2015

Nghiên cứu này trình bày tóm tắt một số kết quả chính của đề tài cấp nhà nước về tạo cây khoai lang kháng bọ hà bằng công nghệ gen. Hai cấu trúc mang gen độc tố kháng bọ hà: *cry3Ca1*, *vip2-1* đã được phân lập, tối ưu hóa mã di truyền, thiết kế vào cấu trúc điều khiển bởi promotor đặc hiệu đối với củ và biến nạp thành công vào giống khoai lang KB1 của Việt Nam theo quy trình tái sinh và chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả đã chọn lọc và tái sinh được 401 dòng khoai lang chuyển gen bao gồm 246 dòng mang gen chuyển *cry3Ca1* và 155 dòng mang gen chuyển *vip2-1*. Phân tích các dòng khoai lang chuyển gen đích bằng phương pháp sinh học phân tử đã thu được 27 dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*, 19 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* dương tính với phản ứng PCR; trong đó 7 dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*, 10 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* đã được phân tích bằng lai Southern. Đề tài cũng đã đánh giá được khả năng kháng bọ hà của một số dòng khoai lang chuyển gen ở điều kiện phòng thí nghiệm. Đồng thời, chứng minh được các dòng chuyển gen *cry3Ca1*, *vip2-1* có khả năng bị thiệt hại bởi bọ hà thấp hơn rõ rệt (với mức độ phá hại PDI trung bình lần lượt là 1,75 và 2,1) so với các dòng đối chứng không chuyển gen (2,55). Kết quả này mở ra triển vọng cải thiện tính kháng bọ hà của cây khoai lang ở Việt Nam thông qua công nghệ gen.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens, chuyển gen, cry3Ca1, gen độc tố, khoai lang, Ipomoea batatas L., vip2-1.*

Chỉ số phân loại *4.6*

Đặt vấn đề

Khoai lang (*Ipomoea batatas* L.) thuộc họ Khoai lang (Convolvulaceae) là một trong những cây trồng quan trọng nhất trên thế giới. Ở nước ta, khoai lang là cây trồng chiếm vị trí quan trọng thứ 4 trong sản xuất lương thực, sau lúa, ngô và sắn. Tổng diện tích trồng khoai lang cả nước là 151.108 ha [1]. Năng suất khoai lang bình quân ở nước ta là 7,8 tấn/ha, thấp hơn nhiều so với năng suất bình quân của các quốc gia ở châu Mỹ và một số nước châu Á. Ngoài các nguyên nhân về giống khoai lang địa phương đã thoái hóa, việc canh tác khoai lang chưa thực hiện đúng quy trình kỹ thuật... thì nguyên nhân dẫn đến năng suất thấp chủ yếu là do tổn thất vì sâu bệnh, đặc biệt là do bọ hà hại khoai. Thiệt hại do bọ hà khoai lang gây ra ở các vùng chuyên canh hoặc trên đất khô hạn có thể lên đến 30-50%.

Gần đây, *Bacillus thuringiensis* (Bt) được xem là phương tiện hiệu quả để kiểm soát côn trùng. Các gen *cry* của *Bt* mã hóa protein tinh thể độc tố có hoạt tính diệt côn trùng được sử dụng phổ biến để chuyển và biểu hiện ở rất nhiều cây trồng quan trọng. Hướng nghiên cứu tạo cây khoai lang chuyển gen mang gen độc tố của Bt cũng đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu [2, 3]. Phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* được sử dụng trong nhiều loài thực vật vì tính hiệu quả, đơn giản và ổn định của nó [4, 5]. Chính vì vậy, có nhiều nghiên cứu đã thành công trong việc sử dụng phương pháp này để tạo cây khoai lang chuyển gen với các tính trạng khác nhau như kháng thuốc diệt cỏ [6, 7], kháng virus [8], cải thiện chất lượng dinh dưỡng [9], thay đổi thành phần tinh bột trong củ [10, 11], và đặc biệt là tạo tính kháng côn trùng ở khoai lang [2, 12]. Ở Việt Nam, cũng đã có một số nghiên cứu về sự tái sinh *in vitro* và chuyển gen vào một số giống khoai lang Việt Nam [13, 14].

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn cần thiết do nguy cơ thiệt hại lớn đối với sản xuất khoai lang do bệnh hà gây

**Tác giả liên hệ:pbngoc@ibt.ac.vn; Tel: 0912247887*

RESULTS IN DEVELOPMENT OF WEEVIL RESISTANT SWEET POTATO LINES BY GENE TECHNOLOGY

Summary

This paper presents the results in developtment of transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. KB1 resistant to sweet potato weevil (*Cylas formicarius*). The two vector constructions were transferred successfully into Vietnam's sweet potato KB1 mediated by *A. tumefaciens* via multiple shoot inducting callus. Totally, the authors selected and regenerated 401 lines, including 246 putative transgenic lines carrying *cry3Ca1* gene and 155 lines with *vip2-1* gene in selection medium. The putative transgenic lines were proved positive by PCR and finalized by Southern hybridization: (1) Twenty seven transgenic lines of *cry3Ca1* and 19 transgenic lines of *vip2-1* gene were proved positive by PCR reaction; (2) Seven putative transgenic lines of *cry3Ca1* and 10 putative transgenic lines of *vip2-1* were proved successfully by Southern hybridization, confirming that the transgenic lines of KB1 cultivars contained a single or two copy of the transgene. Besides, the resistance to sweet potato weevil (*C. formicarius*) of transgenic sweet potato clones was also tested under controlled conditions. The transgenic lines of *cry3Ca1* and *vip2-1* were damaged by *C. formicarius* much lower than wild type. The results are expected to bring a prospect to improve the weevil resistance of sweet potatoes in Vietnam.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens, cry3Ca1 gene, insecticidal gene, ipomoea batatas L., sweet potatoes, transgenic, vip2-1 gene.*

Classification number *4.6*

ra ở Việt Nam, Viện Công nghệ sinh học đã tiến hành đề tài: "Nghiên cứu tạo cây khoai lang kháng bọ hà bằng công nghệ gen" nhằm xây dựng hệ thống tái sinh và chuyển gen ở khoai lang, góp phần tạo giống khoai lang mới mang gen kháng bọ hà. Đề tài thuộc Chương trình nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học trong nông nghiệp, do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: giống khoai lang KB1 do Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam cung cấp; bọ hà trưởng thành thu thập tại ruộng trồng khoai lang xã Tân An, huyện Tân Kỳ, Nghệ An; chủng *A. tumefaciens* C58/pGV2260 mang vector chuyển gen pBI10::spo hoặc pIBT/35S mang các cấu trúc gen *cry-3Ca1/vip2-1* và gen chọn lọc *nptII* được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật (Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

Phương pháp nghiên cứu: các phương pháp nghiên cứu bao gồm: xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* cây khoai lang [15]; xây dựng và tối ưu quy trình chuyển gen vào khoai lang thông qua chuyển gen *gus* [16]; tạo cây khoai lang mang gen kháng bọ hà thông qua *A. tumefaciens* và phương pháp phân tích, đánh giá cây chuyển gen [2, 17].

Kết quả và thảo luận

Kết quả chuyển gen kháng bọ hà vào khoai lang

Để tạo các dòng khoai lang chuyển gen, chủng *A. tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen chứa các gen độc tố *cry-3Ca1, vip2-1* đã được sử dụng để biến nạp vào giống khoai lang KB1. Đỉnh chồi được lây nhiễm với huyền phù *Agrobacterium* chứa các cấu trúc mang gen đích. Sau khi đồng nuôi cấy, mẫu được chuyển sang môi trường không có kháng sinh để phục hồi. Tiếp theo, mẫu được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc CIM, SRM bổ sung 50 mg/l Kanamycin (Km) cho đến khi chồi tái sinh.

Cấu trúc mang gen *cry3Ca1* được biến nạp với 6555 mẫu, chúng tôi thu được 395 chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc bổ sung 50 mg/l Km. Khi chuyển các chồi tái sinh lên môi trường ra rễ có 100 mg/l Km thu được 246/395 (62,27%) cây chuyển gen ra rễ. Còn với lô thí nghiệm đối chứng, mẫu sau khi cắt không được nhiễm khuẩn nhưng được cấy lên các môi trường chọn lọc giống như thí nghiệm chuyển gen, hầu hết các mẫu này bị vàng rồi chết sau khoảng 30 ngày. Tương tự, tiến hành biến nạp cấu trúc mang gen *vip2-1* với 5 lô thí nghiệm, tổng số mẫu tương ứng là 9927. Qua quá trình nuôi cấy và chọn lọc chúng tôi đã thu được 155 chồi mang gen *vip2-1* trên môi trường bổ sung 100 mg/l Km (bảng 1, hình 1A-C).

Phân tích và đánh giá các dòng khoai lang chuyển gen sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử

Các dòng khoai lang chuyển gen ra rễ trên môi trường chọn lọc (401 dòng) được chuyển ra trồng trong bầu đất ở nhà lưới (hình 1D). Sau 2 tuần, thu lá mới của các dòng khoai lang chuyển gen và dòng không chuyển gen (ĐC), tiến hành tách chiết DNA tổng số. Các mẫu DNA sau khi tách được dùng làm khuôn để tiến hành phản ứng PCR nhân gen *cry3Ca1* và *vip2-1* với cặp mồi đặc hiệu *cry3Ca1*op_F/R, vip2-1op_F/R.

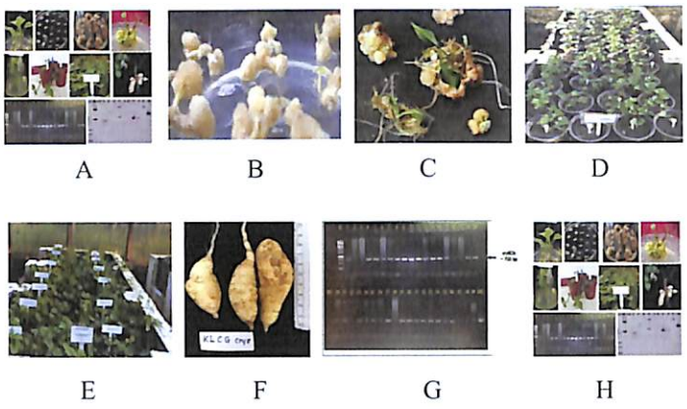
DNA tổng số (1 µg) của các dòng khoai lang chuyển gen được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Đồng thời, vector chuyển gen mang các cấu trúc gen chuyển cũng được sử dụng làm đối chứng dương cho phản ứng. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR thu được 27 dòng chuyển gen *cry3Ca1* (đạt hiệu suất 0,41%), 19 dòng chuyển gen *vip2-1* đạt hiệu suất 0,191% (bảng 1, hình 1G). Các dòng này cho kết quả PCR dương tính với các cặp mồi đặc hiệu thiết kế là *cry3Ca1*op_F/R, vip2-1op_F/R với sản phẩm là đoạn DNA có kích thước lần lượt tương ứng là gần 800 bp và 1,1 kb.

Kết quả phân tích trên cho thấy, nhiều dòng khoai lang mặc dù vẫn sống sót và ra rễ trên môi trường chọn lọc bổ sung kháng sinh Km 100 mg/l nhưng lại cho kết quả âm tính khi thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Điều này có thể do sự đứt gãy đoạn gen đích trong vector tái tổ hợp, do đó các dòng cây chuyển gen này chỉ mang gen kháng kháng sinh hoặc gen kháng kháng sinh và một phần gen đích, dẫn đến cặp mồi nhân gen không bám vào được để thực hiện phản ứng PCR. Trong chuyển gen, việc mất gen đích và sắp xếp lại gen trong T-DNA sau khi được chuyển vào tế bào cây chủ có thể xảy ra và đã được tìm thấy trong thực nghiệm [18, 19].

Bảng 1: hiệu quả biến nạp các cấu trúc mang gen kháng bọ hà vào khoai lang

Gen chuyển	Số mẫu	Số chồi ra rễ*/ số chồi tái sinh	Số cây PCR+/số cây ra rễ (%)	Hiệu suất chuyển gen (%)	Mức độ phá hại (PDI) trung bình**
cry3Ca1	6555	246/395	27/246 (10,97)	0,41	1,75
vip2-1	9927	155/343	19/155 (12,25)	0,191	2,1
ĐC	100	0	0	0	2,55

**: chồi khoai lang ra rễ trên môi trường bổ sung 100 mg/l Km; **: đánh giá khả năng kháng bọ hà của củ các dòng khoai lang chuyển gen ở điều kiện phòng thí nghiệm; ĐC: đối chứng*



Hình 1: một số hình ảnh chuyển các cấu trúc gen đích vào khoai lang (A) Mẫu chuyển gen trên môi trường đồng nuôi cấy; (B) Mô sẹo trên môi trường chọn lọc bổ sung 50 mg/l Km; (C) Chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc; (D) Cây khoai lang chuyển gen trồng trong chậu đất ở nhà kính; (E),(F) Trồng và thu củ khoai lang chuyển gen ở Trại thực nghiệm sinh học; (G) Phân tích các dòng khoai lang chuyển gen bằng phản ứng PCR; (H) Phân tích các dòng khoai lang chuyển gen bằng lai Southern

Các dòng khoai lang chuyển gen dương tính với PCR tiếp tục được phân tích bằng lai Southern. Kết quả lai Southern đã thu được 7 dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*, 10 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* (hình 1H) cho một đến hai băng ở vị trí khác nhau, điều này chứng tỏ các dòng khoai lang này có chứa đoạn gen đích được lai với mẫu dò gen chuyển tương ứng. Trong khi đó, ở đối chứng âm là dòng khoai lang không chuyển gen không cho vạch băng nào (hình 1H). Chứng tỏ quá trình chuyển các cấu trúc gen đích vào giống khoai lang đã thành công.

Như vậy, có thể thấy hiệu suất chuyển các gen độc tố diệt bọ hà vào giống khoai lang KB1 rất thấp. Hiện tượng khó chuyển gen ngoại lai vào khoai lang cũng đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới công bố. Một số nghiên cứu cho thấy, các giống khoai lang có các phản ứng rất khác nhau trong quá trình tái sinh khi được nuôi cấy ở cùng điều kiện *in vitro* [20, 21]. Hơn nữa, khả năng tái sinh thường chỉ giới hạn ở một số rất ít các giống có kiểu gen nhất định, còn lại phần lớn các giống tỏ ra "ngoan cố" [22]. Vì lý do này, di truyền là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến tiến trình nuôi cấy *in vitro*, khả năng tái sinh và hệ quả là khả năng đáp ứng biến đổi gen của các giống khoai lang [17]. Bên cạnh đó, do khoai lang là cây lục bội thể và kém ổn định về mặt di truyền, đặc biệt là các cây được tái sinh từ các cụm chồi có nguồn gốc từ callus nên việc chọn lọc được các dòng khoai lang mang gen chuyển có sự di truyền ổn định qua các lần cấy chuyển trong một khoảng thời gian dài nuôi cấy *in vitro* sẽ khó khăn hơn.

Okada đã thu được 3 dòng khoai lang chuyển gen kháng virus SPFMV bằng cách chuyển gen mã hóa protein vỏ virus bằng phương pháp xung điện. Nhóm nghiên cứu đã phân tích sự phiên mã, dịch mã của gen bằng các phương pháp Nothern và Western và cũng đã phân tích tính kháng virus của các dòng khoai lang chuyển gen [23]. Hiện tượng chuyển gen với tần số thấp còn gặp ở một số nghiên cứu chuyển gen vào một số giống cây trồng khác ở Việt Nam. Phan Tường Lộc và các tác giả đã tiến hành chuyển gen kháng sâu *cry1Ab và cry1B-cry1Ab* bằng *A. tumefaciens* vào hai giống mía VN 844137 và Suphanbury 7 nhằm mục đích tạo ra các giống mía có khả năng kháng sâu đục thân. Bước đầu đã thu được các khối mô sẹo có biểu hiện GUS và kháng chất chọn lọc phosphinothricin (ppt) ở nồng độ 3 mg/l [24]. Khi phân tích bằng PCR và Southern blot các chồi tái sinh từ mô sẹo kháng ppt đã thu được 3 dòng chuyển gen *cry1Ab* và 1 dòng chuyển gen *cry1B-cry1Ab*. Khi kiểm tra biểu hiện protein với que thử nhanh, cả 4 dòng chuyển gen đều cho kết quả dương tính [25]. Nguyễn Thị Thu Hiền đã chuyển thành công cấu trúc SLHEP-HA1 vào cây đậu tương và thu được 8 dòng cây đậu tương ở thế hệ T0 dương tính với phản ứng PCR. Khi phân tích Western blot đã thu được một dòng đậu tương H11 ở thế hệ T1 biểu hiện protein tái tổ hợp HA1 trong hạt [26].

Đánh giá khả năng kháng bọ hà của các dòng khoai lang chuyển gen

Các dòng khoai lang chuyển gen dương tính với phương pháp lai Southern được trồng ở nhà lưới tại Trại thực nghiệm Cổ Nhuế (hình 1E). Sau khoảng 100-120 ngày, khi có dấu hiệu củ chín sinh lý biểu hiện là 1/3 số lá (chủ yếu là lá gốc) chuyển vàng tự nhiên thì tiến hành thu hoạch củ (hình 1F). Phân loại khối lượng củ và đánh giá tính kháng bọ hà của các củ khoai lang này.

Theo giá trị PDI thu được, củ của các dòng khoai lang chuyển gen đều thể hiện mức độ bị thiệt hại bởi bọ hà thấp hơn so với lô đối chứng là giống khoai lang KB1 không chuyển gen ở điều kiện phòng thí nghiệm (bảng 1). Chúng tôi thu được củ của 4 dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*, củ của 6 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* với giá trị PDI đạt trung bình của các dòng khoai lang chuyển gen đích đạt lần lượt là 1,75 và 2,1. Trong khi dòng đối chứng có mức độ phá hại bởi bọ hà (PDI) là 2,55 (bảng 1).

Hiện nay, trên thế giới chỉ có duy nhất 3 công trình liên quan đến việc tạo ra các dòng khoai lang Jewel chuyển gen kháng bọ hà [2, 3, 12]. Morán đã đánh giá tính kháng với bọ hà của các cây chuyển gen dưới điều kiện nhà kính cho thấy 2 dòng chuyển gen đã biểu hiện sự kháng với bọ hà tốt hơn so với các cây đối chứng. Trong thí nghiệm này, sự thiệt hại trong củ của các dòng C1 và C27 ít hơn khoảng 2-5 lần so với cây đối chứng [2]. Newell và các tác giả (1995) đã phân tích các dòng khoai lang Jewel chuyển gen *CTI* và *GNA*. Cây chuyển gen thu được biểu hiện hoạt tính của enzyme β-Glucoronidase và các protein ức chế Cowpea trypsin và Snowdrop lectin, tuy nhiên các nhà khoa học không đưa ra các dẫn liệu liên quan đến tính kháng côn trùng ở các dòng chuyển gen [12]. García và các tác giả (2000) đã nghiên cứu tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng để lựa chọn thành phần môi trường phù hợp cho tái sinh cây khoai lang chuyển gen *cry3A* vào giống khoai lang Jewel để kháng bọ hà, tuy nhiên mức độ biểu hiện protein ở các dòng chuyển gen thu được rất thấp [3]. Nhóm tác giả này cho rằng, một trong những nguyên nhân chủ yếu do gen Bt chưa được tối ưu mã trước khi sử dụng chuyển gen thực vật.

Cho đến nay, chưa có công bố nào về chuyển gen *vip* và gen độc tố mới vào khoai lang. Moellenbeck sử dụng độc tố 2 thành phần *cry*34/35 và *vip*1/2 mang lại hiệu quả cao trong việc chống sâu hại rễ ngô. Ngoài ra, việc sử dụng protein vip3 đang mang lại hiệu quả cao hơn nhiều so với sử dụng protein cry trong việc tiêu diệt ấu trùng bướm trên phạm vi rộng [27].

Kết luận

Hai cấu trúc mang gen đích là *cry3Ca1* và *vip2-1* đã được biến nạp thành công vào giống khoai lang KB1 theo quy trình tái sinh và chuyển gen thông qua *Agrobacterium* đã xây dựng. Kết quả đã chọn lọc và tái sinh được 401 dòng khoai lang chuyển gen, trong đó có 27 dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*, 19 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* dương tính với phản ứng PCR, 7 dòng *cry3Ca1*, 10 dòng khoai lang chuyển gen *vip2-1* được chứng minh có mang các bản sao gen chuyển bằng lai Southern. Củ của các dòng khoai lang chuyển gen đã được đánh giá khả năng kháng bọ hà ở điều kiện phòng thí nghiệm. Chứng minh được các dòng chuyển gen *cry3Ca1* và *vip2-1* có khả năng bị thiệt hại bởi bọ hà thấp hơn rõ rệt (với mức độ phá hại PDI trung bình lần lượt là 1,75 và 2,1) so với các dòng đối chứng không chuyển gen (2,55).

Lời cảm ơn

Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài "Nghiên cứu tạo giống khoai lang kháng bọ hà bằng công nghệ gen" và sự hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

[1] http://faostat3.fao.org.

[2] Morán R, García R, López A, Zaldúa Z, Mena J, García M, Armas R, Somonte D, Rodríguez J, Gómezm M, Pimentel E (1998), "Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis", *Plant Sci*, **139**, pp.175-184.

[3] García R, Morán R, Mena J, Somontes D, Zaldúa Z, López A, García M (2000), "Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) regeneration and transformation technology to provide weevil (*Cylas formicarius*) resistance", *Plant genetic Engineering: Towards the Third Millennium.*

[4] Hansen G, Shillito R.D, Chilton M.D (1997), "T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes", *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, pp.11726-11730.

[5] Yu B, Zhai H, Wang Y, Zang N, Wang Y, Liu Q (2007), "Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **90**, pp.265-273.

[6] Anwar N, Junko K, Watarabe A (2011), "Transgenic sweet potato expressing mammalian cytochrome P450", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **105**, pp.219-231.

[7] Otani M, Wakita Y, Shimada T (2003), "Production of herbicide resistant sweet potato *(Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation", *Breed Sci*, **53**, pp.145-148.

[8] Sivparsad B.J, Gubba A (2014), "Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA)", *Transgenic Research*, **23(2)**, pp.377-388.

[9] Wakita Y, Otani M, Hamada T, Mori M, Iba K, Shimada T (2001), "A tobacco microsomal x-3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)", *Plant Cell Rep*, **20**, pp.244-249.

[10] Kimura T, Otani M, Noda T, Ideta O, Shimada T, Saito A (2001), "Absence of amylose in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] following the introduction of granule-bound starch synthase cDNA", *Plant Cell Rep*, **20**, pp.663-666.

[11] Shimada T, Otani M, Hamada T, Kim S.H (2006), "Increase of amylose content of sweetpotato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (IbSBEII)", *Plant Biotechnology*, **23**, pp.85-90.

[12] Newell C.A, Lowe J.M, Merryweather A, Rooke L.M, Hamilton W.D.O (1995), "Transformation of sweet potato *(Ipomoea batatas* (L.) Lam) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin", *Plant Sci*, **107(2)**, pp.215-227.

[13] Phạm Bích Ngọc, Đinh Thị Phòng, Egnin M, Prakash C.S, Lê Trần Bình (2002), "Hoàn thiện phương pháp chuyển gen vào một số giống khoai lang Việt Nam thông qua *Agrobacterium tumefaciens*", *Tạp chí KH&CN, Viện KH&CN Việt Nam*, **40**, pp.142-149.

[14] Lê Thị Muội (1996), *Báo cáo tổng kết đề tài KC08-15: "Sử dụng công nghệ tế bào thực vật trong việc tạo giống cây trồng có khả năng chống chịu điều kiện bất lợi (phèn, mặn, nóng, lạnh)"*, Viện Công nghệ sinh học.

[15] Vũ Thị Lan, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Đình Trọng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2013), "Hiệu quả của ABA và GA3 lên quá trình tạo đa chồi từ mô sẹo ở khoai lang *Ipomoea batatas* (L.) Lam", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **11(4)**, pp.727-734.

[16] Vũ Thị Lan, Mai Thị Phương Nga, Nguyễn Trung Nam, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2013), *Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen gus vào khoai lang thông qua Agrobacterium tumefaciens*, Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013, pp.888-892.

[17] Garvel N.J, Jarret R.L (1991), "A modified CTAB DNA extraction procedure for *Muss* and *Ipomoea*", *Plant Mol Biol Rep*, **9**, pp.262-266.

[18] Chyi Y, Jorgense R.A, Goldstein D, Tanksley S.D, Loaiza-Figueroa F (1986), "Locations and stability of Agrobacterim-mediated T-DNA insertions in the Lycopersicon genome", *Mol Gen Genet*, **204**, pp.64-69.

[19] Nguyễn Thị Hải Yến (2012), *Nghiên cứu tạo cây cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá do virus bằng kỹ thuật chuyển gen*, Luận án tiến sỹ sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

[20] Gosukonda R.M, Dessai A.P, Blay E, Prakash C.S, Peterson C.M (1995), "Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweetpotato *(Ipomoea batatas)*", *In vitro Cell Dev Biol*, **31(2)**, pp.65-71.

[21] González R.G, Sánchez D.S, Campos J.M, Vázquez E.P, Guerra Z.Z, Quesada A.L, Valdivia R.M, González M.G (1999), "Plant regeneration from leaf and stem explants from two sweet potato (*Ipomoea batatas L.* Lam) cultivars", *Biotecnologia Aplicada*, **16(1)**, pp.11-14.

[22] Liu Q.C, Zhai H, Wang Y, Zhang D.P (2001), "Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweet potato", *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, **37**, pp.564-567.

[23] Okada Y, Saito A, Nishiguchi M, Kimura T, Mori M, Hanada K, Sakai J, Miyazaki C, Matsuda Y, Murata T (2001), "Virus resistance in transgenic sweetpotato [*Ipomoea batatas (L.) Lam*] expressing the coat protein gene of sweetpotato fearther mottle virus", *Theor Appl Genet*, **103**, pp.743-751.

[24] Phan Tường Lộc, Hoàng Văn Dương, Mai Trường, Lê Tấn Đức, Trần Thị Ngọc Hà, Văn Đắc Thành, Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Hữu Hồ (2012), "Bước đầu chuyển gen Bt vào cây mía (*Saccharum officinarum* L.)", *Tạp chí Sinh học*, **34(3SE)**, pp.170-179.

[25] Phan Tường Lộc, Hoàng Văn Dương, Mai Trường, Lê Tấn Đức, Trần Thị Ngọc Hà, Văn Đắc Thành, Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Hữu Hồ (2014), "Chuyển gen kháng sâu *cry1Ab, cry1B-cry1Ab* vào cây mía (*Saccharum officinarum* L.)", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **12(7)**, pp.1058-1067.

[26] Nguyễn Thị Thu Hiền (2014), *Nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein bề mặt của virus H5N1 vào cây đậu tương phục vụ sản xuất vaccine thực vật*, Luận án tiến sỹ sinh học, Đại học Thái Nguyên.

[27] Moellenbeck D.J, Peters M.L, Bing J.W, Rouse J.R, Higgins L.S, Sims L, Nevshemal T, Marshall L, Ellis R.T, Bystrak P.G (2001), "Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms", *Nat Biotechnol*, **19**, pp.668-672.