Tạp chí Công nghệ Sinh học 9(2): 195-208, 2011

NGHIÊN CỨU, ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG LÚA CHUYỂN GEN SIÊU BIỂU HIỆN VÀ BẤT HOẠT YẾU TỐ PHIÊN MÃ OsMADS26

Khổng Ngân Giang[1, 3], Lê Quỳnh Mai[1], Nguyễn Thành Đức[1, 3], Hà Thị Thúy[1, 3], Pascal Gantet[2, 3], Đỗ Năng Vịnh[1,3]

[1]*Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam*
[2]*Đại học Montpellier 2, Pháp*
[3]*Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội*

TÓM TẮT

Ở thực vật có hoa, họ yếu tố phiên mã MADS-box được tổ chức thành 11 nhóm. Phân tích di truyền cho thấy rằng hầu hết các gen thuộc họ MADS-box đều tham gia vào kiểm soát các quá trình phát triển khác nhau như thời gian ra hoa, sự phát triển của hoa và cơ quan sinh sản, sự phát triển của quả và hiện tượng rụng hoa. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu chức năng của gen *OsMADS26* ở lúa. Gen *OsMADS26* có nguồn gốc phát sinh loài rất gần với gen *AGAMOUS-LIKE12 (AGL12)* ở *Arabidopsis thaliana*. *AGL12* kiểm soát hoạt động của mô phân sinh rễ và thời gian ra hoa. Để nghiên cứu chức năng của gen *OsMADS26*, chúng tôi đã tạo ra các dòng lúa chuyển gen siêu biểu hiện hoặc gây bất hoạt gen *OsMADS26* và đánh giá kiểu hình của các dòng lúa chuyển gen này. Sự phát triển của bộ rễ và tính hướng trọng lực của các dòng lúa bất hoạt gen OsMADS26 giảm đáng kể, ngoài ra chiều cao cây, số nhánh của các dòng này cũng bị giảm và thời gian ra hoa muộn hơn so với các dòng lúa đối chứng. Ở các dòng siêu biểu hiện *OsMAD26*, ngoại trừ tính hướng trọng lực của bộ rễ phát triển mạnh hơn, các quá trình sinh trưởng và phát triển diễn ra tương đồng với các dòng đối chứng. Từ những kết quả thu được cho thấy *OsMADS26* tham gia vào kiểm soát quá trình phát triển của rễ và thân nói chung và sự ra hoa ở cây lúa. Điều này cho thấy, *OsMADS26* ở lúa, cũng như *AGL12* ở *Arabidopsis thaliana* có liên quan đến kiểm soát một số con đường phát triển của thực vật. Các dòng đột biến siêu biểu hiện hoặc làm mất chức năng của *OsMADS26* sẽ tiếp tục được nghiên cứu để xác định chính xác chức năng ở mức độ phân tử của yếu tố phiên mã *OsMADS26*.

Từ khóa: *Bất hoạt gen, bộ rễ lúa, OsMADS26, siêu biểu hiện, yếu tố phiên mã*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong ba cây lương thực quan trọng nhất, do đó cây lúa đã và đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Đối với các nước đang phát triển, hạn hán và sự suy thoái chất lượng đất đai đã và đang ảnh hưởng nghiêm trọng tới sản lượng cây trồng trong đó có cây lúa, do vậy việc nghiên cứu tạo ra các giống lúa chịu hạn tốt và ổn định vẫn là biện pháp tối ưu trong tình hình hiện nay.

Việc xác định những gen chìa khóa tham gia vào quá trình phân nhánh bộ rễ ở cây lúa có thể cho phép sử dụng các chỉ thị phân tử vào việc chọn lọc những tính trạng cấu trúc bộ rễ lúa phù hợp với khả năng chịu hạn của lúa.

Các yếu tố phiên mã là những protein có khả năng bám vào các đoạn trình tự đặc thù trên DNA và đo vậy tham gia vào việc điều khiển phiên mã gen (Gene transcription). Các yếu tố phiên mã cũng đã được chứng minh có lợi trong việc cải thiện khả năng kháng stress ở các cây chuyển gen thông qua việc điều khiển biểu hiện của các gen đích kháng stress (Shinozaki *et al.*, 2003; Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 2005).

Sản phẩm của các gen cảm ứng với stress ở lúa cũng được phân làm 2 nhóm protein hoạt động và protein điều khiển (Rabbani *et al.*, 2003). Phân tích và so sánh các gen cảm ứng với stress ở *Arabidopsis* với các gen cảm ứng với stress ở lúa cho thấy sự tương đồng đáng kể trong các phản ứng với stress giữa 2 hệ gen ở mức độ phân tử. Trong số 73 gen cảm ứng với stress được xác định ở thực vật, 51 gen đã được tìm thấy ở *Arabidopsis* với chức năng tương tự. Những kết quả này khẳng định rằng lúa và *Arabidopsis* có chung một số lượng lớn các gen cảm ứng với stress mặc dù 2 loài này tiến hoá riêng rẽ hơn 1 triệu năm trước đây.

Họ gen MADS-box mã hóa cho các yếu tố phiên mã có vùng bảo thủ gắn với DNA được gọi là MADS-box. Những gen này có mặt trong các sinh vật sống và

có chức năng rất đa dạng. Các gen MADS-box trong thực vật có thể được chia thành hai nhóm dựa vào tiến hóa: dạng I và dạng II (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Becker, Theissen, 2003). Có khoảng 100 gen ở *Arabidopsis* và 70 gen ở lúa (*Oryza sativa*) thuộc nhóm MADS-box đã được dự đoán chức năng (Nam *et al.*, 2004). Khoảng 40 gen MADS-box dạng II trong *Arabidopsis* và lúa đã được xác định (Kofuji *et al.*, 2003; Parenicova *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; 2008) và được chia thành 11 nhóm (Becker, Theissen, 2003; Lee *et al.*, 2003; Arora *et al.*, 2007). Becker và Theissen (2003) đã nhận định rằng nhóm gen AGL12 khởi nguồn từ 300 triệu năm trước, trước khi có sự phân chia thành cây hạt trần và cây hạt kín. Ở *Arabidopsis*, qua phân tích Northern blot, duy nhất gen MADS-box thuộc nhóm AGL12 có biểu hiện đặc hiệu ở rễ (Rounsley *et al.*, 1995). Gần đây, khi phân tích siêu biểu hiện của AGL12 trong dịch tế bào của *Catharanthus roseus*, Montiel và đồng tác giả (2004) đã chỉ ra rằng gen này giúp cho quá trình gắn kết các tế bào thành dạng khối tế bào. Khi phân tích bằng phương pháp làm mất chức năng gen, AGL12 đã được làm rõ là điều hòa quá trình phân chia tế bào mô phân sinh rễ và ra hoa (Tapia-Lopez *et al.*, 2008). Ở cây lúa, gen OsMADS26 biểu hiện không chỉ trong rễ mà còn ở chồi và nhánh (Shinozuka *et al.*, 1999). Pelucchi và đồng tác giả (2002) cũng nhận thấy là OsMADS26 biểu hiện mạnh ở lá và cụm hoa, Arora và đồng tác giả (2007) đã chỉ ra sự biểu hiện của gen này trong cành nhánh và hạt. Từ các kết quả này có thể dự đoán chức năng đa dạng của gen này trong các cơ quan của cây lúa. Gần đây, Lee và đồng tác giả (2008) đã công bố thêm vai trò của nhóm gen MADS-box - SVP của lúa trong phản ứng lại sự lão hóa.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu, đánh giá cây lúa siêu biểu hiện với yếu tố phiên mã OsMADS26, đồng thời cũng tiến hành gây bất hoạt yếu tố phiên mã này để thấy rõ vai trò chức năng của gen OsMADS26 ảnh hưởng tới kiểu hình cây lúa và đặc biệt là hình thái bộ rễ, yếu tố cơ bản quyết định đến khả năng chịu hạn của cây lúa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng cho các thí nghiệm về tạo callus, tái sinh cây lúa và chuyển gen cây lúa *Oryza sativa* ssp japonica giống Nipponbare được cung cấp bởi trung tâm quốc tế nghiên cứu phát triển nông nghiệp (CIRAD), Pháp.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mang các vector gây siêu biểu hiện và bất hoạt gen OsMADS26 dùng cho chuyển gen.

Hóa chất: Các thang DNA 1 kb (Fermentas), các enzyme giới hạn (BioLabs)

Vector chuyển gen siêu biểu hiện pC5300, gây bất hoạt pANDA.

Bacto pepton, Yeast Extract, NaCl, Agarose, Sucrose, Glucose, Trypton, KCl, Tris HCl, EDTA, NaOH, $MgSO_4$, $MgCl_2$, Glycerol, $CaCl_2$, Ethanol, nước khử ion. Các loại kháng sinh Kanamycin, Rifamycin, Cefotaxim, Streptomycin, Hygromycin và các hóa chất thông dụng khác của các hãng có uy tín như Fermentas, Invitrogen, Merck, Sigma...

Thiết bị: Máy PCR System 9700 (Apply Biosystem, Mỹ), máy điện di (BioRad, Mỹ), máy soi DNA, máy vortex, máy ly tâm. Các tủ nuôi cấy tạo callus, các dàn nuôi cấy, máy lắc ngang ổn nhiệt... và các trang thiết bị khác thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền nông nghiệp.

Phương pháp

Xác định các gen của các yếu tố phiên mã có liên quan đến cấu trúc và chức năng của bộ rễ lúa

Việc tìm kiếm mối tương quan giữa các gen ở lúa tương đồng với các gen như NAC1, ANR1, AGL12, AGL14, AGL17, AGL19 và AGL21 ở *Arabidopsis thaliana* đã được thực hiện bằng phần mềm GreenPhylIDB (http://greenphyl.cines.fr/cgi-bin/greenphyl.cgi) do các nhà khoa học Pháp xây dựng nhằm xác định mối tương quan về tiến hoá thông qua so sánh các trình tự gen giữa lúa và Arabidopsis

Chuyển gen

Giống lúa Nipponbare (japonica) đã được sử dụng trong quá trình chuyển gen vào callus thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* dựa trên phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium* đã được mô tả bởi Jeon và đồng tác giả (1999) và Lee và đồng tác giả (1999).

Chọn lọc, đánh giá cây chuyển gen ở mức độ kiểu hình

Ở giai đoạn cây con: Xác định tăng trưởng chiều dài rễ chính trong 7 ngày đầu tiên sau khi nảy mầm trên môi trường MS/2 thạch. So sánh độ dài, độ dày, số lượng rễ phụ, độ ăn sâu, tính hướng trọng lực của

các cây chuyển gen siêu biểu hiện và cây bất hoạt với cây đối chứng.

Ở giai đoạn cây trưởng thành: Xác định sự sinh trưởng, phát triển và ra hoa.

Giai đoạn sinh trưởng: Đếm số nhánh, đo chiều cao cây. Mật độ đo: 1 lần/tuần.

Giai đoạn ra hoa và hạt chín: Theo dõi ngày ra hoa: ngày bông đầu tiên xuất hiện, quan sát hình thái bộ rễ sau khi thu hoạch hạt lúa.

Các số liệu thu thập được được xử lý bằng phần mềm ANOVA.

Chọn lọc, đánh giá cây chuyển gen ở mức độ sinh lý

Các dòng lúa chuyển gen gây siêu biểu hiện hoặc bất hoạt gen OsMADS26 trồng trong điều kiện gây áp suất thẩm thấu nhân tạo (MS/2+125 mM Manitol) và trong điều kiện đối chứng (MS/2) và được đánh giá một số chỉ tiêu sinh lý.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định các gen của các yếu tố phiên mã có liên quan đến cấu trúc và chức năng của bộ rễ lúa

Việc tìm kiếm mối tương quan giữa các gen ở lúa tương đồng với các gen như NAC1, ANR1, AGL12, AGL14, AGL17, AGL19 và AGL21 ở *Arabidopsis thaliana* đã được thực hiện bằng phần mềm GreenPhylDB (http://greenphyl.cines.fr/cgi-bin/greenphyl.cgi) do các nhà khoa học Pháp xây dựng nhằm xác định mối tương quan về tiến hoá thông qua so sánh các trình tự gen giữa lúa và *Arabidopsis*.

Kết quả bảng 1 và hình 1 cho ta thấy độ tương đồng cao giữa AGL12 ở *Arabidopsis* với gen MAD26 ở lúa (OsMADS26 - Os08g02070.1).

Theo Tapia-Lopez và đồng tác giả (2008), khi nghiên cứu cây đột biến gen AGL12 ở *Arabidopsis*, nhận thấy gen này có chức năng trong điều hòa phân chia tế bào ở đỉnh sinh trưởng rễ chính. Đồng thời khi nghiên cứu promoter của gen AGL12 bằng phương pháp gắn promoter với gen chỉ thị GUS tác giả cũng nhận thấy gen chỉ thị biểu hiện trong mô phloem dưới kích thích của auxin. Điều này giúp chúng tôi dự đoán chức năng của gen tương đồng AGL12 ở lúa là gen OsMADS26. Bằng các phương pháp gây siêu biểu hiện, bất hoạt gen OsMADS26 và phân tích các cây chuyển gen sẽ giúp chúng tôi hiểu rõ hơn về chức năng của OsMADS26 trong cây lúa.

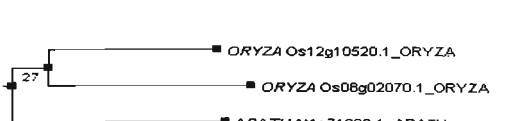
Chuyển gen

Các vector siêu biểu hiện và bất hoạt gen được chuyển vào callus lúa thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*.

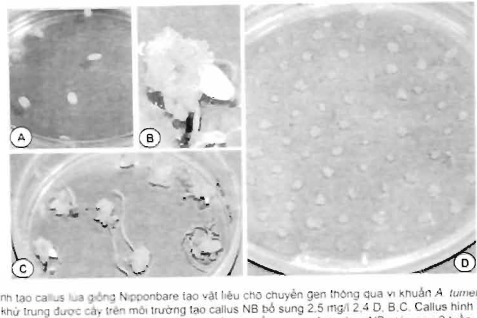
Hạt lúa Nipponbare được khử trùng và cấy khoảng 10 hạt lên đĩa môi trường NB và được nuôi cấy trong điều kiện không chiếu sáng, 28°C trong thời gian 3 tuần. Kết quả hình thành callus được thể hiện trong hình 2.

Bảng 1. Kết quả xác định các gen ở lúa tương đồng với AGL12 (At1g71692.1).

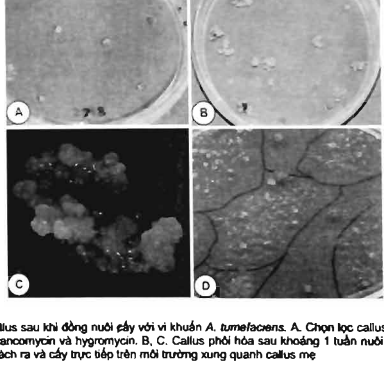
	UniProt	Alias	o	n	s	D
Os08g02070.1	Q0J8G8	MAD26	96	100	19	0.42103
Os12g10520.1	Q2QW55	MAD33	81	100	4	0.44001



Hình 1. Sơ đồ mối tương đồng giữa gen AGL12 (At1g71692.1) và OsMADS26 (Os08g02070.1).



Hình 2. Quá trình tạo callus lúa giống Nipponbare tạo vật liệu cho chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. A.Hạt lúa Nipponbare đã khử trùng được cấy trên môi trường tạo callus NB bổ sung 2,5 mg/l 2,4 D. B,C. Callus hình thành từ phôi sau 3 tuần nuôi cấy hạt trên môi trường NB. D. Callus được cấy chuyển sang môi trường NB mới, sau 2 tuần, những callus này sẽ được sử dụng để chuyển gen



Hình 3. Chọn lọc các callus sau khi đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens*. A. Chọn lọc callus trên môi trường chọn lọc (R2S) chứa cefotaxim, vancomycin và hygromycin. B, C. Callus phôi hóa sau khoảng 1 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc. D.Callus con được tách ra và cấy trực tiếp trên môi trường xung quanh callus mẹ

Các callus được tạo thành sẽ được sử dụng làm nguyên liệu cho chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* có mang vector siêu biểu hiện hoặc bất hoạt gen. Callus lúa được tiến hành đồng nuôi cấy với dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có bổ sung Acetosyringone (100μM) là chất dẫn dụ vi khuẩn *A. tumefaciens* trong thời gian 15 phút sau đó được thấm khô bằng giấy thấm đã khử trùng và

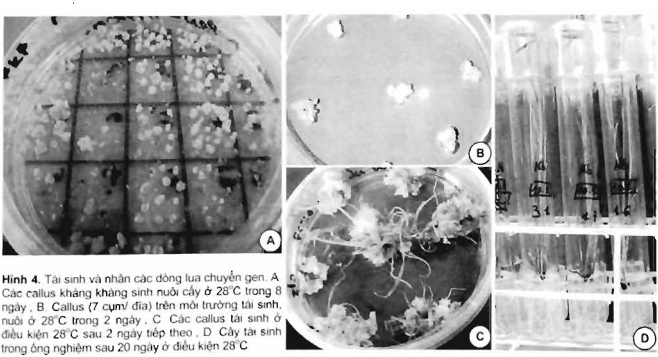
nuôi cấy trên môi trường đồng nuôi cấy đặc (R2) có bổ sung Acetosyringone (100µM), với mật độ 10 callus/đĩa, (Hình 3). Các hộp lồng này được đặt trong điều kiện bóng tối, nhiệt độ 25°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, các callus khỏe và sạch, được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc (R2S) với cùng mật độ như trên (10 callus/đĩa), có bổ sung kháng sinh cefotaxim và vancomycin nhằm diệt vi khuẩn *A. tumefaciens* còn sót lại và hygromycin để chọn lọc các callus đã chuyển được vector vào. Các hộp lồng được đặt trong điều kiện chiếu sáng, nhiệt độ 28°C từ 2-3 tuần. Sau khoảng 1 tuần những callus đã mang gen quan tâm, phản ứng tốt với môi trường nuôi cấy sẽ phồi hóa (Hình 3). Những callus con mới được tạo thành từ callus mẹ ban đầu sẽ được tách ra và cấy tiếp xúc trực tiếp với môi trường xung quanh callus mẹ (Hình 3) và giữ như vậy trong cùng điều kiện nuôi cấy như trên thêm 1 - 2 tuần nữa.

Khi các callus mới đạt đến kích thước 2 - 3 mm về đường kính (Hình 4A) sẽ được cấy chuyển sang môi trường tiền tái sinh đã được tối ưu là môi trường RNB (trên nền môi trường NB) có bổ sung các hormone sinh trưởng ABA (5mg/L), BAP (2 mg/L), NAA (1 mg/L) và nuôi cấy trong cùng điều kiện ánh sáng như trên trong 3 tuần (Hình 4B). Sau 3 tuần, những cây lúa con được tái sinh từ các callus (Hình 4C) sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ trên nền môi trường MS bổ sung thêm 50g/L saccharose chứa trong các ống nghiệm nhằm tạo cho các cây con phát triển bộ rễ hoàn chỉnh (Hình 4D). Sau 4 tuần nuôi cấy, các cây con hoàn chỉnh được chuyển ra cấy trong điều kiện nhà lưới.

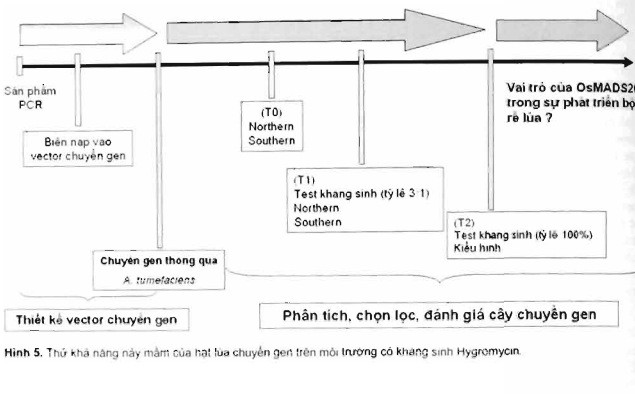
Các hạt lúa của dòng cây chuyển gen và bất hoạt sau khi thu hoạch được tiến hành nuôi cấy trên môi trường MS/2 có bổ sung kháng sinh chọn lọc là hygromycin (50 mg/L). Trên hình 5, các hạt lúa có khả năng nảy mầm tốt trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc biểu hiện sự có mặt của gen kháng kháng sinh hygromycin trong cây chuyển gen.

Các dòng lúa chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen được chọn lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc. Quy trình chuyển gen và chọn lọc cây lúa chuyển gen được mô tả như trong hình 5.

Dựa vào các phương pháp chọn lọc trên môi trường kháng sinh, kết quả Southern blot, Northern blot, chúng tôi đã xác định được 9 dòng lúa chuyển gen siêu biểu hiện, bất hoạt gen OsMADS26 và chuyển gen đối chứng (Bảng 2) phục vụ cho đánh giá cây chuyển gen ở mức độ kiểu hình.



Hình 4. Tái sinh và nhân các dòng lúa chuyển gen. A. Các callus kháng kháng sinh nuôi cấy ở 28°C trong 8 ngày , B. Callus (7 cụm/ đĩa) trên môi trường tái sinh, nuôi ở 28°C trong 2 ngày , C. Các callus tái sinh ở điều kiện 28°C sau 2 ngày tiếp theo , D. Cây tái sinh trong ống nghiệm sau 20 ngày ở điều kiện 28°C



Hình 5. Thử khả năng nảy mầm của hạt lúa chuyển gen trên môi trường có kháng sinh Hygromycin.

Bảng 2. Các dòng lua chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen OsMADS26

Tên dòng	Chú giải
WT1	Đối chứng không chuyển gen
PCO-294.2	Đối chứng chuyển với vector rỗng PC5300.OE được dùng để gây siêu biểu hiện gen OsMADS26
PDO-290.5	Đối chứng chuyển với vector rỗng pANDA được dùng để gây silencing gen OsMADS26
PC8-7.2 **PC8-51.1**	Dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26
PD8.1-97.2 **PD8.1-98.3**	Dòng bất hoạt gen OsMADS26 được chuyển với pANDA chứa GST8.1
PD8.2-115.6 **PD8.2-121.1**	Dòng bất hoạt gen OsMADS26 được chuyển với pANDA chứa GST8.2

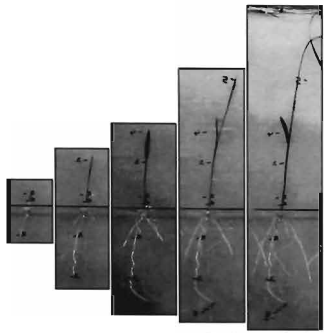
Chọn lọc, phân tích, đánh giá các cây lúa chuyển gen

Chọn lọc cây chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen nghiên cứu ở mức độ kiểu hình

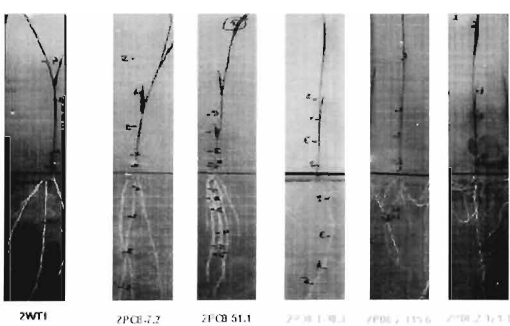
Sự tăng trưởng về chiều dài của rễ chính: được đánh dấu hàng ngày sau 2 ngày cấy (Hình 6).

Kết quả cho thấy (Hình 6, 7) dòng siêu biểu hiện gen có bộ rễ hẹp và dày, rễ phụ ăn mọc sâu xuống phía dưới, còn đối với dòng bất hoạt gen rễ mọc nông hơn và mất tính định hướng.

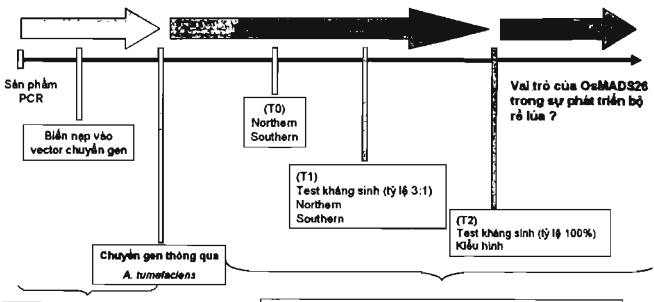
Một đặc điểm nữa có thể nhận ra là mật độ rễ bên của các dòng siêu biểu hiện dày hơn so với các dòng gây bất hoạt và dòng đối chứng (Hình 7). Để kiểm chứng nhận định này, chúng tôi đã tiến hành so sánh mật độ rễ giữa các dòng bằng cách đo khoảng cách giữa 2 rễ bên ngoài cùng ở 1 cm phía dưới hạt và đếm số rễ bên có trong khoảng cách đo được của từng cây lúa theo hình minh họa dưới đây (Hình 8A).



Hình 6. Hình thái rễ sau thay đổi từ 2 đến 7 ngày tuổi



Hình 7. Hình thái bộ rễ lúa ở các dòng chuyển gen khác nhau (7 ngày tuổi).



Hình 5. Thử khả năng nảy mầm của hạt lúa chuyển gen trên môi trường có kháng sinh Hygromycin.

Bảng 2. Các dòng lúa chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen OsMADS26.

Tên dòng	Chú giải
WT1	Đối chứng không chuyển gen
PCO-294.2	Đối chứng chuyển với vector rỗng PC5300.OE được dùng để gây siêu biểu hiện gen OsMADS26
PDO-290.5	Đối chứng chuyển với vector rỗng pANDA được dùng để gây silencing gen OsMADS26
PC8-7.2 PC8-51.1	Dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26
PD8.1-97.2 PD8.1-98.3	Dòng bất hoạt gen OsMADS26 được chuyển với pANDA chứa GST8.1
PD8.2-115.6 PD8.2-121.1	Dòng bất hoạt gen OsMADS26 được chuyển với pANDA chứa GST8.2

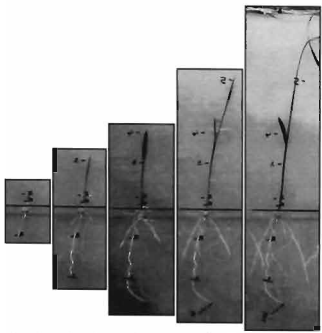
Chọn lọc, phân tích, đánh giá các cây lúa chuyển gen

Chọn lọc cây chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen nghiên cứu ở mức độ kiểu hình

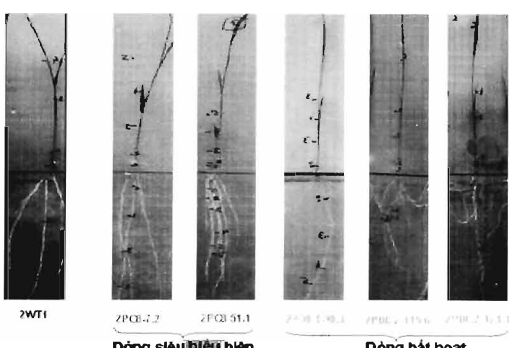
Sự tăng trưởng về chiều dài của rễ chính: được đánh dấu hàng ngày sau 2 ngày cấy (Hình 6).

Kết quả cho thấy (Hình 6, 7) dòng siêu biểu hiện gen có bộ rễ hẹp và dày, rễ phụ ăn mọc sâu xuống phía dưới, còn đối với dòng bất hoạt gen rễ mọc nông hơn và mất tính định hướng.

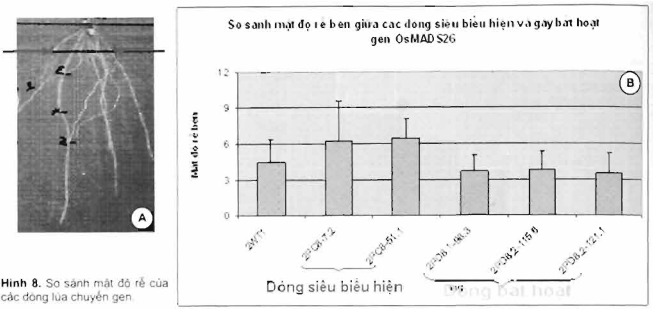
Một đặc điểm nữa có thể nhận ra là mật độ rễ bên của các dòng siêu biểu hiện dày hơn so với các dòng gây bất hoạt và dòng đối chứng (Hình 7). Để kiểm chứng nhận định này, chúng tôi đã tiến hành so sánh mật độ rễ giữa các dòng bằng cách đo khoảng cách giữa 2 rễ bên ngoài cùng ở 1 cm phía dưới hạt và đếm số rễ bên có trong khoảng cách đo được của từng cây lúa theo hình minh họa dưới đây (Hình 8A).



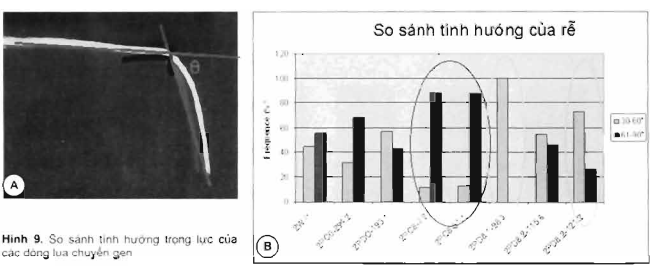
Hình 6. Hình thái rễ sau thay đổi từ 2 đến 7 ngày tuổi



Hình 7. Hình thái bộ rễ lúa ở các dòng chuyển gen khác nhau (7 ngày tuổi).



Hình 8. So sánh mật độ rễ của các dòng lúa chuyển gen



Hình 9. So sánh tính hướng trọng lực của các dòng lúa chuyển gen

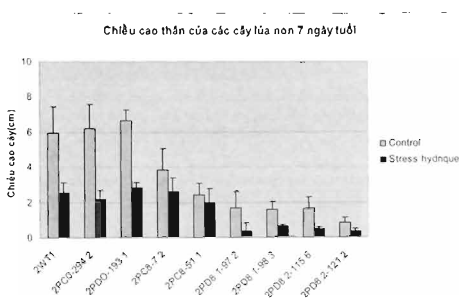
Mật độ rễ được tính bằng tỷ lệ giữa số rễ đếm được và khoảng cách giữa 2 rễ bên ngoài cùng. Kết quả được trình bày trong hình 8B.

Mật độ rễ bên của các dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26 ở cây lúa con 7 ngày tuổi đạt từ 6 - 7 rễ/cm, cao hơn so với cây đối chứng không chuyển gen (3,5 - 4 rễ/cm) trong khi mật độ rễ ở các dòng gây bất hoạt gen thấp hơn so với cây đối chứng. Kết quả ban đầu này cho thấy gen OsMADS26 có thể tham gia vào việc hình thành rễ bên của cây lúa.

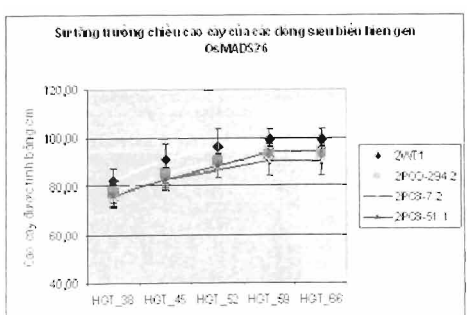
Để nghiên cứu vai trò của gen OsMADS26 trong việc quy định tính hướng của rễ giữa các dòng siêu biểu hiện và dòng gây bất hoạt chúng tôi đã tiến hành lặp lại thí nghiệm đã được công bố bởi Inukai và cộng sự (Inukai *et al.*, 2005).Chúng tôi đã tiến hành đo các góc được hình thành sau 24 h giữa rễ chính và đỉnh sinh trưởng của nó theo hình minh họa dưới đây (Hình 9A). Các góc đo được được chia làm 2 loại từ 30 - 60° và từ 61 - 90° (Hình 9B).

Kết quả được trình bày trong hình 9B cho thấy số cây tạo các góc từ 60 - 90° nhiều hơn ở các dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26 so với đối chứng và ngược lại thấp hơn ở các dòng mà gen OsMADS26 bị gây bất hoạt so với đối chứng. Hay nói cách khác các dòng lúa siêu biểu hiện gen OsMADS26 phản

ứng mạnh hơn với sự thay đổi tính hướng trong khi các dòng bị bất hoạt gen này dường như "mất" đi khả năng này.Kết quả đo và so sánh chiều cao thân của tất cả các dòng nghiên cứu siêu biểu hiện, bất hoạt gen OsMADS26 và cả đối chứng trong hai điều kiện nuôi trồng gây áp suất thẩm thấu và đối chứng (Hình 10) đã chứng minh nhận định từ quan sát của chúng tôi: Chiều cao thân của các dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26 (2PC8-7.2 và 2PC8-51.1) giảm đi ít nhất khi được trồng trong điều kiện gây áp suất thẩm thấu so với các dòng đối chứng và gen bị gây bất hoạt. Điều này có thể lý giải rằng việc gây siêu biểu hiện gen OsMADS26 đã tạo cho các cây lúa một trạng thái stress thường trực, do đó đã dẫn đến việc giảm tăng trưởng chiều cao thân ngay cả trong điều kiện bình thường so với các cây đối chứng hoặc cây bị bất hoạt gen được trồng trong cùng điều kiện.



Hình 10. So sánh chiều cao thân của các dòng lúa chuyển gen gây siêu biểu hiện hoặc bất hoạt gen OsMADS26 trong điều kiện đối chứng (MS/2) và gây stress áp suất thẩm thấu (MS/2 + 125 mM Manitol)



Hình 11. Tăng trưởng chiều cao cây của các dòng siêu biểu hiện gen

Đánh giá cây chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen nghiên cứu ở mức độ kiểu hình

Chiều cao cây

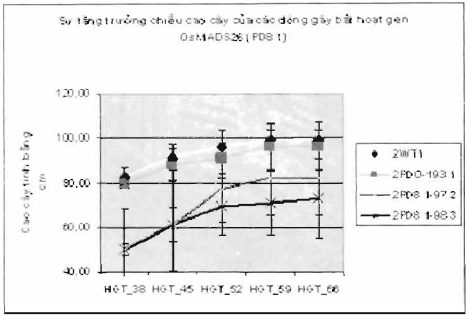
Mặc dù ở giai đoạn 7 ngày tuổi, các cây lúa của dòng siêu biểu hiện (PC8) có chiều cao thấp hơn so với các cây đối chứng nhưng đến giai đoạn trưởng thành chiều cao của các cây này đã đạt được cùng mức với các cây đối chứng, 90 - 100 cm (Hình 11).

Ngược lại chiều cao của các cây dòng gây bất hoạt gen OsMADS26 (PD8.1 và PD8.2) luôn thấp hơn các cây đối chứng không những ở giai đoạn cây con mà còn kéo dài cho tới lúc trưởng thành, nhất là các dòng 2PD8.1-97.2 và 2PD8.1-98.3, chỉ đạt 75 cm đến 82 cm so với đối chứng (95 - 100 cm) (Hình 12).

Số nhánh

Đối với các dòng siêu biểu hiện, tương tự như chiều cao cây, các dòng siêu biểu hiện có số nhánh bằng (dòng 2PC8-7.2.3) hoặc ít hơn (14 nhánh, dòng 2PC8-51.1) không đáng kể so với đối chứng (18 - 22 nhánh) (Hình 13).

Tuy nhiên các dòng bất hoạt gen có số nhánh chỉ bằng một nửa (8 - 10 nhánh) so với đối chứng (20 nhánh) ở mức sai khác có ý nghĩa 5%. (Hình 14).



Hình 12. Tăng trưởng chiều cao cây của các dòng gây bất hoạt gen

Ngày ra hoa

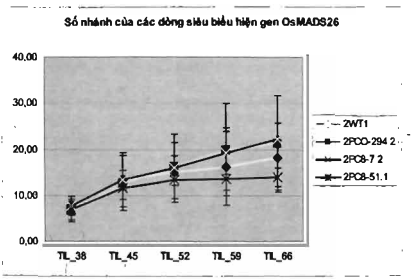
Ngày ra hoa là một trong những chỉ tiêu quan trọng trong việc chọn tạo giống lúa trong điều kiện hạn hán. Nếu hạn hán xảy ra trước thời kỳ ra hoa thì ảnh hưởng của nó đến năng suất không đáng kể nhưng nếu nó xảy ra trong thời kỳ ra hoa thì năng suất có thể bị giảm đi 50% hoặc hơn nữa.

Ngày ra hoa của các dòng siêu biểu hiện gen là 48 ngày sau khi gieo, chênh lệch không có ý nghĩa so với đối chứng (2 - 3 ngày) trong khi các dòng bất hoạt cùng gen OsMADS26 ra hoa muộn hơn, đặc biệt là 2 dòng 2PD8.1-97.2 và 2PD8.1-98.3 muộn hơn đối chứng 9 - 10 ngày, sai khác có ý nghĩa mức 5% (Hình 15).

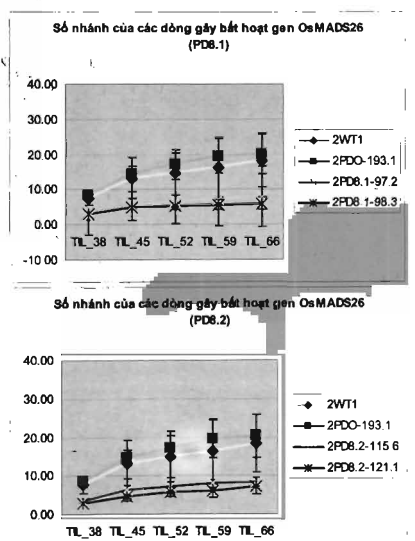
Hình thái bộ rễ

Bộ rễ lúa của các dòng siêu biểu hiện gen OsMADS26 phát triển bình thường so với các dòng đối chứng trong khi ở các dòng bất hoạt gen sự phân nhánh và số lượng rễ bên giảm đi rất nhiều (Hình 16).

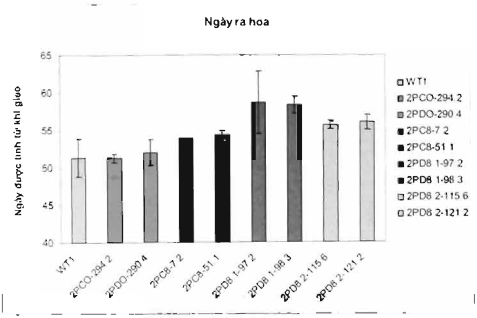
Kết quả nghiên cứu, đánh giá ban đầu của chúng tôi về các đặc điểm hình thái của các dòng chuyển gen siêu biểu hiện và bất hoạt gen OsMADS26 đóng vai trò quan trọng trong các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây lúa. Trong đó, chúng tôi nhận thấy ngày ra hoa và sự phân nhánh, tạo rễ bên của bộ rễ lúa suy giảm nghiêm trọng ở các dòng mà gen OsMADS26 bị gây bất hoạt.



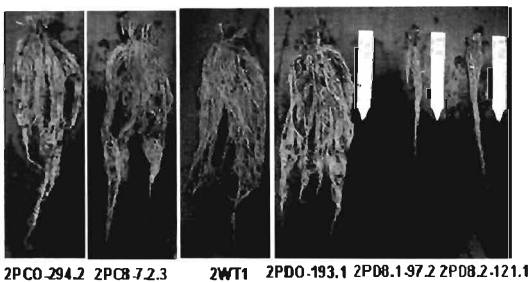
Hình 13. Sự tăng trưởng chiều cao cây của các dòng bất hoạt gen OsMADS26



Hình 14. So sánh số nhánh tạo thành của dòng bất hoạt gen với cây đối chứng.



Hình 15. Thời gian ra hoa của các dòng lúa chuyển gen.



Hình 16. Hình thái bộ rễ lúa sau thu hạt của các dòng lúa chuyển gen.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được yếu tố phiên mã OsMADS26 từ mẫu RNA tách chiết từ rễ cây lúa, nhân thành công các đoạn GST tương ứng với gen OsMADS26 nhằm thiết kế vector bất hoạt gen.

Đã chuyển thành công các vector siêu biểu hiện hoặc bất hoạt gen vào callus lúa (giống nipponbare) thông qua vi khuẩn *A. tumefacies*.

Thu nhận 2 dòng lúa chuyển gen siêu biểu hiện gen OsMADS26 (PC8-7.2; PC851.1); 4 dòng lúa chuyển gen bất hoạt gen OsMADS26 (PD8.1-97.2; PD8.1-98.3; PD8.2-115.6; PD8.2-121.1).

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu đánh giá cây lúa siêu biểu hiện, cũng như bất hoạt yếu tố phiên mã OsMADS26, chúng tôi nhận thấy có mối liên hệ đặc biệt giữa gen này với với hình thái bộ rễ cây lúa như ảnh hưởng đến mật độ rễ, tính