

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ *MtOsDREB1A* LIÊN QUAN TÍNH CHỊU HẠN VÀO GIỐNG LÚA VIỆT NAM

Cao Lê Quyên¹, Trần Tuấn Tú²,
Đình Đoàn Long³, Phạm Xuân Hội¹

683503

TÓM TẮT

Gen *DREB1A* đã được phân lập từ nhiều loài thực vật như *Arabidopsis*, ngô, cải dầu, lúa mạch, lúa, cà chua và lúa mì. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh gen *DREB1A* tăng cường tính chịu hạn trong các cây trồng chuyển gen. Trong một nghiên cứu đã công bố trước đây, gen *MtOsDREB1A* đã được phân lập và đưa vào vector chuyển gen dưới sự điều khiển của promoter Ubiquitin và Lip9. Trong nghiên cứu này, gen *OsDREB1A* được chuyển thành công vào giống lúa Chanh Trui cho phép tiến hành việc phân tích khả năng chịu hạn của các dòng lúa chuyển gen. Kết quả với 29 dòng lúa chuyển gen đã thu được có 17 dòng mang một bản sao (copy), 12 dòng lúa chuyển gen mang hơn một bản sao (copy). Phân tích di truyền xác định được 17 cây lúa đồng hợp tử thuộc 9 dòng lúa chuyển gen *MtOsDREB1A* trong nghiên cứu này. Các dòng lúa chuyển gen ở thể đồng hợp tử này sẵn sàng cho việc phân tích khả năng kháng hạn hoặc chuyển gen *MtOsDREB1A* sang các giống lúa khác bằng lai truyền thống, để tạo ra các giống lúa có khả năng chống chịu hạn.

Từ khóa: Chịu hạn, chuyển gen, nhân tố phiên mã, qRT-PCR, Southern Blot.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Trong bối cảnh biến đổi khí hậu toàn cầu, tình trạng hạn hán xảy ra ngày càng thường xuyên hơn với mức độ ngày càng trầm trọng, nhiều lúc vượt quá tầm kiểm soát của con người. Hạn là yếu tố môi trường gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất nông nghiệp, làm giảm năng suất, sản lượng cây trồng và dẫn tới tình trạng mất an ninh lương thực (Bray et al., 2000). Do đó, việc tạo giống cây trồng biến đổi gen có khả năng chịu hạn có ý nghĩa đặc biệt quan trọng đối với việc duy trì và tăng sản lượng nông nghiệp, góp phần giữ ổn định an ninh lương thực quốc gia.

Các nhân tố phiên mã đáp ứng hạn DREB/CBF bao gồm DREB1s và DREB2s tương tác đặc hiệu với nhân tố hoạt hóa cis đáp ứng hạn DRE/CRT với trình tự lõi A/GCCGAC (DRE = dehydration responsive element/CRT = C repeat responsive element) và điều hòa biểu hiện của rất nhiều gen chức năng cảm ứng với điều kiện hạn, mặn và lạnh ở *Arabidopsis* (Liu et al., 1998). Trên cây mô hình, tăng cường biểu hiện liên tục nhân tố phiên mã *DREB1A* giúp tăng cường tính kháng hạn, mặn và lạnh của cây chuyển gen,

tuy nhiên sinh trưởng của các cây chuyển gen lại bị ảnh hưởng (Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999). Trong nghiên cứu khác, biểu hiện gen *DREB1A* dưới sự điều khiển của promoter RD29A (promoter cảm ứng) không ảnh hưởng đến sinh trưởng trong các cây chuyển gen (Kasuga et al., 1999). Bên cạnh cây mô hình *Arabidopsis*, gen *DREB1/CBF* đã được phân lập từ nhiều loài thực vật khác như ngô, cải dầu, lúa mạch, lúa, cà chua và lúa mì (Mizoi et al., 2012). Biểu hiện nhân tố phiên mã *DREB1/CBF* tăng cường tính chịu hạn ở các cây trồng chuyển gen như cây cúc (Hong et al., 2006), lạc/đậu phộng (Bhatnagar-Mathur et al., 2007; Bhatnagar-Mathur et al., 2013), khoai tây (Behnam et al., 2007; Iwaki et al., 2013), lúa (Oh et al., 2005; Ito et al., 2006; Datta et al., 2012), đậu tương (Polizel et al., 2011; de Paiva Rolla et al., 2013), thuốc lá (Kasuga et al., 2004), cà chua (Hsieh et al., 2002a,b) và lúa mì (Pellegrineschi et al., 2004; Saint Pierre et al., 2012).

Trong một nghiên cứu trước đây (Cao Lê Quyên và cs, 2012), đã phân lập được gen *MtOsDREB1A* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu dựa trên khuôn là thư viện cADN xử lý hạn giống lúa Mộc Tuyền (Mt). Trong nghiên cứu này, đã tiến hành chuyển gen *MtOsDREB1A* phân lập được vào giống lúa Chanh Trui và phân tích, sàng lọc cây chuyển gen để đánh giá tiềm năng tăng cường tính chịu hạn

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Viện Nghiên cứu vì Sự Phát triển, Pháp

³ Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

của gen mã hóa nhân tố phiên mã *MtOsDREB1A* trong các cây lúa Chanh Trụi chuyển gen.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống lúa Chanh Trụi là giống lúa chịu hạn được dùng để chuyển gen nhằm tạo giống chuyển gen trực tiếp tạo giống lúa chịu hạn mà không cần lai tạo, là giống lúa duy nhất có khả năng tiếp nhận gen lạ trong tập đoàn giống lúa Việt Nam, được cung cấp

bởi Trung tâm Tài nguyên Thực vật. Các chủng vi khuẩn *Agrobacterium* LBA4404 có chứa vector mang gen *MtOsDREB1A* biểu hiện dưới sự điều khiển promoter Ubiquitin, Lip9 và vector trống (empty vector) được cung cấp bởi Bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các cặp mồi được thiết kế và sử dụng trong nghiên cứu có trình tự như ở bảng 1 được sinh tổng hợp bởi Sigma (Mỹ).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên oligo	Trình tự	Gen/vector
OsDREB1A-t-Fw	5'-GACGACGACGAGGAGTCCGC3'OH	<i>MtOsDREB1A</i>
Hyg-Fw	5'-AAACTGTGATGGACGACACCGT3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-Rv	5'-GTGGCGATCCTGCAAGCTCC3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-RT-Fw	5'-CGAAGAATCTCGTGCTTTCA3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-RT-Rv	5'-ATGCAAAGTGCCGATAAACA3'OH	<i>HPT</i>
Lip9-Fw	5'-GCGAATAGTTCTTGCTGATC3'OH	pBIG
Ubi-Fw	5'-CCCTGCCTTCATACGCTATT3'OH	pBIG
NosT-Rv	5'-AGACCGGCAACAGGATTCAA3'OH	pBIG

Bộ hóa chất MESA Blue của Hãng Eurogentec được dùng cho phản ứng PCR định lượng, bộ DIG-HighPrimer DNA Labeling and Detection Starter Kit II của Hãng Roche được dùng cho thí nghiệm Southern Blotting. Các hóa chất cơ bản, các chất kích thích sinh trưởng, kháng sinh sử dụng trong nuôi cấy mô được mua ở Công ty Sigma (Mỹ) và Merck (Đức).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuyển gen *MtOsDREB1A* vào giống lúa Chanh Trụi

Gen *MtOsDREB1A* được biến nạp vào lúa Chanh Trụi thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* với qui trình của phòng Bệnh học Phân tử (Quyện và cs, 2009). Hạt lúa được bóc vỏ và tiến hành khử trùng bằng dung dịch nước Javel (NaOCl 5%) trong 10 phút. Tiếp đó, hạt lúa được rửa lại bằng nước cất khử trùng (10 lần) và làm khô trên giấy thấm. Hạt khử trùng được đặt lên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l 2,4-D. Sau 10 ngày giữ trong môi trường tối ở 28°C, các callus (thể chai) được lựa chọn phục vụ thao tác chuyển gen với vi khuẩn *Agrobacterium*, tiếp đó hạt được đặt lên môi trường đồng nuôi cấy 3 ngày. Các callus (thể chai) sau thao tác chuyển gen tiếp tục đặt lên môi trường chọn lọc có bổ sung 50 mg/l

hygromyxin và 250 mg/l cefotaxim (2 tuần chuyển môi trường một lần). Sau 2 lần chọn lọc thì các callus còn sống được chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung 50 mg/l hygromyxin và 250 mg/l cefotaxim. Các chồi tái sinh chuyển sang môi trường ra rễ trước khi được chuyển ra cốc đất ở điều kiện bên ngoài.

2.2.2. Đánh giá số lượng bản sao của gen chuyển

- Phản ứng PCR định lượng theo thời gian thực (Quantitative Real Time: qRT-PCR), sử dụng bộ kit MESA Blue của Hãng Eurogentec: Số lượng bản sao (copy) được tính toán bằng cách so sánh giá trị Ct (Threshold cycle, là số chu kỳ mà tại đó sản phẩm khuếch đại có thể được phát hiện bởi sự thay đổi của tín hiệu huỳnh quang) của hygromyxin và gen đối chứng theo công thức quy đổi $NC = 2^{\Delta Ct}$ (trong đó $\Delta Ct = C_{t \text{ Hygromycin}} - C_{t \text{ đối chứng}}$) được đề nghị bởi Zhang và cộng sự, 2013. Theo đó ở thể hệ T_0 do cây chuyển gen đều là thể dị hợp tử nên nếu Ct của hygromyxin (dị hợp tử) xấp xỉ hoặc lớn $C_{t \text{ đối chứng}}$ (đồng hợp) thì cây chuyển gen sẽ mang nhiều hơn 1 bản sao trong tế bào. Ở thể hệ T_0 việc 1 cây chuyển gen được cho là chỉ mang 1 bản sao (copy) khi tỷ số quy đổi $2^{\Delta Ct}$ dao động trong khoảng từ 0,4 đến 0,7; hơn một bản

sao (copy) khoảng từ 0,4 đến 0,7; hơn một bản sao (copy) được tính toán bằng cách so sánh giá trị Ct (Threshold cycle, là số chu kỳ mà tại đó sản phẩm khuếch đại có thể được phát hiện bởi sự thay đổi của tín hiệu huỳnh quang) của hygromyxin và gen đối chứng theo công thức quy đổi $NC = 2^{\Delta Ct}$ (trong đó $\Delta Ct = C_{t \text{ Hygromycin}} - C_{t \text{ đối chứng}}$) được đề nghị bởi Zhang và cộng sự, 2013. Theo đó ở thể hệ T_0 do cây chuyển gen đều là thể dị hợp tử nên nếu Ct của hygromyxin (dị hợp tử) xấp xỉ hoặc lớn $C_{t \text{ đối chứng}}$ (đồng hợp) thì cây chuyển gen sẽ mang nhiều hơn 1 bản sao trong tế bào. Ở thể hệ T_0 việc 1 cây chuyển gen được cho là chỉ mang 1 bản sao (copy) khi tỷ số quy đổi $2^{\Delta Ct}$ dao động trong khoảng từ 0,4 đến 0,7; hơn một bản

sao (copy) khi tỷ số quy đổi 2^{Act} dao động trong khoảng từ 0,9 đến lớn hơn 1,2.

Phương pháp lai Southern: Sử dụng bộ kit DIG-Hight Primer-DNA Labeling và Detecion Starter Kit II của Hãng Roche và tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất. Cấu trúc chuyển gen trong các dòng tái sinh được phát hiện dựa trên sự bắt cặp đặc hiệu giữa probe (đoạn DNA được tổng hợp bằng PCR đặc hiệu với cặp mồi Hyg-RT-Fw và Hyg-RT-Rv) có đánh dấu huỳnh quang (DIG-dUTP) với ADN hệ gen đã được cắt với enzym giới hạn *HindIII*. Mỗi đoạn ADN bắt cặp đặc hiệu với đoạn DNA (1 băng hiện hình trên phim) tương ứng với 1 cấu trúc chuyển gen đã được chèn trong hệ gen của cây chuyển gen. Số lượng băng hiện hình (southern blotting-profile) tương ứng với số lượng bản sao của cấu trúc chuyển gen trong hệ gen của cây chuyển gen.

2.2.3. Sàng lọc cá thể đồng hợp tử

Tỷ lệ nảy mầm trên hygromyxin. Các hạt lúa chuyển gen đặt lên môi trường MS có bổ sung 50 mg/l hygromyxin. Tỷ lệ nảy mầm được tính bằng số hạt nảy mầm trên tổng số hạt đặt lên môi trường.

Phản ứng Quantitative Real-time-PCR Tương tự như xác định số lượng bản sao (copy) ở thể hệ T_0 thì ở thể hệ T_1 tỷ số quy đổi còn cho phép xác định mức

đồng hợp tử và dị hợp tử của các cây chuyển gen mang 1 bản sao (copy). Theo đó tỷ số quy đổi 2^{Act} dao động trong khoảng 0,4 đến 0,7 như trên cây sẽ được đánh giá là dị hợp tử còn nếu tỷ số quy đổi xấp xỉ 1 cây sẽ được đánh giá là đồng hợp tử.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chuyển gen *MtOsDREB1A* vào giống lúa Chanh Trại

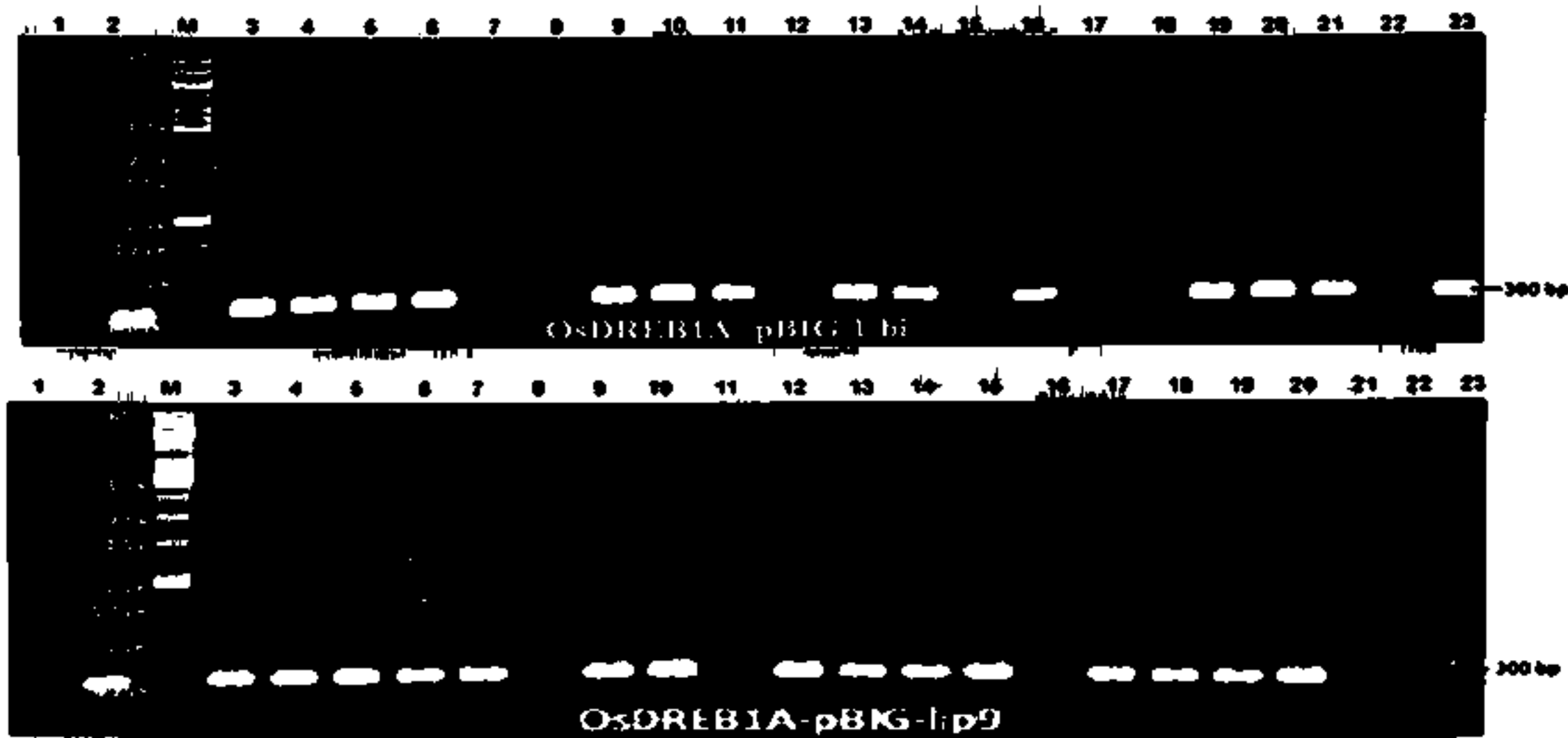
Tổng số 400 callus được lấy nhiễm với tế bào vi khuẩn *Agrobacterium* mang các cấu trúc biểu hiện gen *MtOsDREB1A* (*Lip9.MtOsDREB1A* và *Ubi.MtOsDREB1A*) và cấu trúc vector không mang gen (*pBI-Lip9* và *pBI-Ubi*) được đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối tại 28°C. Sau hai tuần trên môi trường chọn lọc 1 thì còn 315 callus sống sót cho tổng 4 công thức thí nghiệm (đạt tỷ lệ từ 75% đến 81%, bảng 2) được chuyển sang môi trường chọn lọc 2. Trên môi trường chọn lọc 2 còn 121 callus sống sót cho toàn bộ 4 công thức chuyển gen (cụ thể đạt được từ 28% đến 34% so với số hạt xuất phát ban đầu) được chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung hygromyxin. Các callus còn sống trên môi trường chọn lọc được chuyển lên môi trường tái sinh và thu được 74 cây tái sinh, đạt tỷ lệ từ 14% đến 22% so với số hạt xuất phát ban đầu (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả chuyển các cấu trúc chuyển gen khác nhau trên lúa Chanh Trại

Các giai đoạn	<i>Lip9.MtOsDREB1A</i>	<i>Ubi.MtOsDREB1A</i>	<i>pBI-Lip9</i>	<i>pBI-Ubi</i>
Số hạt xuất phát ban đầu	100	100	100	100
Số callus thu được trên môi trường chọn lọc 1	75	81	79	80
Số callus thu được trên môi trường chọn lọc 2	28	34	30	29
Số callus thu được trên môi trường tái sinh	22	22	14	16
Số chồi/cây cho kết quả PCR dương tính	15	14	12	9
Số cây tiếp tục sinh trưởng trong nhà kính	14	13	9	7
Số dòng cây T_0 chuyển gen cho hạt	10	9	6	4

Kết quả kiểm tra bằng phản ứng PCR ở hình 1 sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen và vector (*OsDREB1A-Fw* và *NosT-Rv*) và cặp mồi đặc hiệu cho gen đánh dấu *HPT* (*Hyg-Fw* và *Hyg-Rv*, kết quả không trình bày) cho thấy 29/44 dòng lúa chuyển gen cho kết quả dương tính, chứng tỏ các cấu trúc biểu hiện gen đã được biến nạp thành công trong

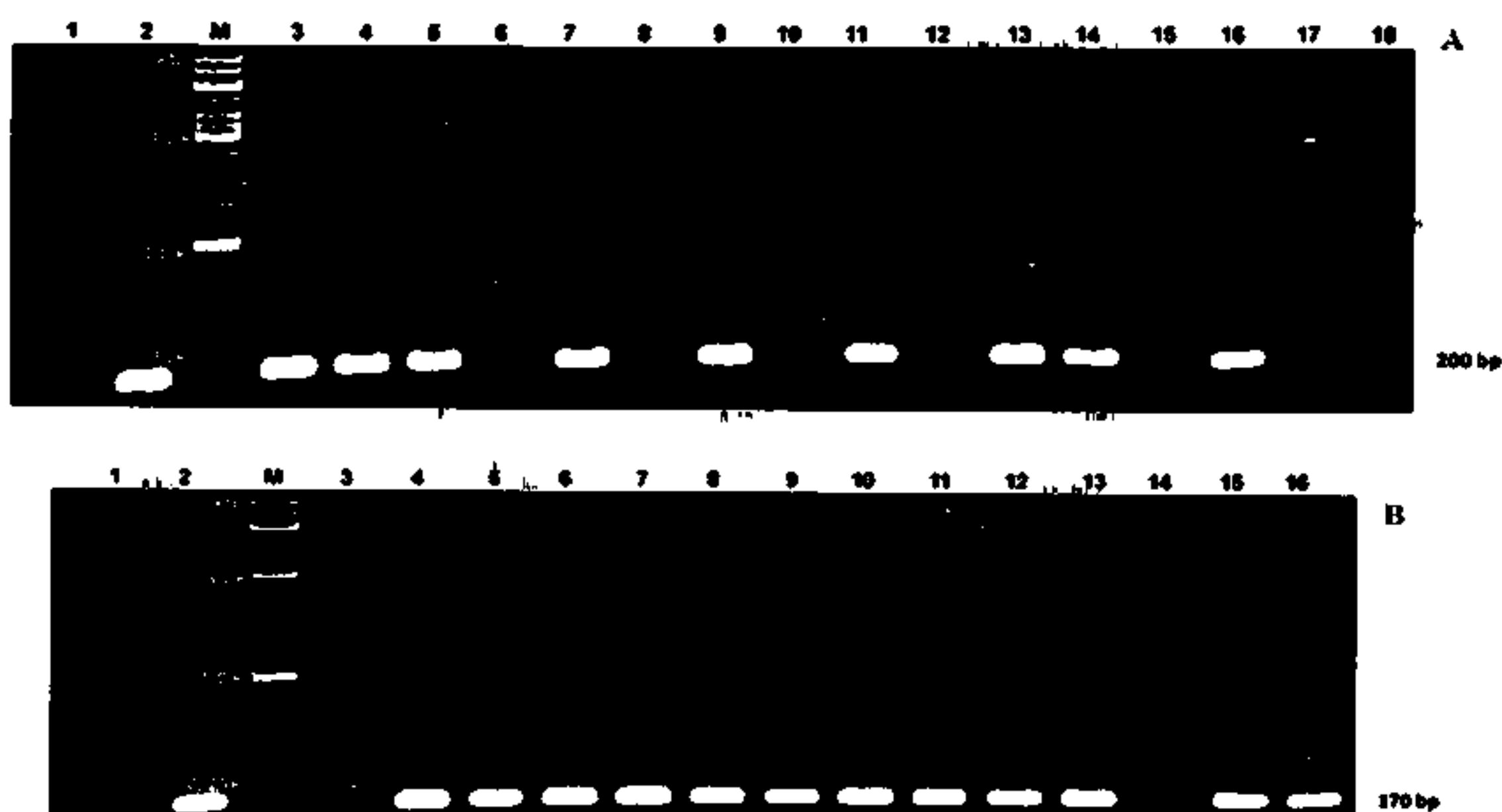
giống lúa Chanh Trại với tỷ lệ từ 14% đến 15% (Bảng 2). Tương tự các dòng biến nạp với vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector trống cũng đã được kiểm tra đồng thời với hai cặp mồi đặc hiệu vector (*Lip9-Fw/Ubi-Fw* và *NosT-Rv*) và gen đánh dấu. Kết quả cho thấy với thí nghiệm chuyển gen vector trống tỷ lệ đạt được từ 9% đến 12% so với số hạt xuất phát ban đầu (Bảng 2 và hình 2).



Hình 1. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *MtOsDRE1A* trong cây chuyển gen
*M: Thang chuẩn ADN 1 kb; giếng 1: Đối chứng âm; giếng 2: Đối chứng dương; giếng 4-24: Các dòng lúa chuyển gen *MtOsDRE1A**

Các dòng lúa chuyển gen cho kết quả PCR dương tính được đưa ra bầu đất để làm quen với môi trường bên ngoài trước khi trồng vào bình đất trong điều kiện nhà lưới. Chỉ có 29 dòng lúa chuyển gen cho thu hạt, trong đó 10 dòng lúa mang gen *Lip9*:

MtOsDREB1A, 9 dòng lúa mang gen *Ubi*; *MtOsDREB1A*, 6 dòng lúa mang cấu trúc vector trống *pBIG-Lip9* và 4 dòng mang cấu trúc vector *pBIG-Ubi* (Bảng 2).



Hình 2. Kết quả kiểm tra sự có mặt của vector trống trong cây lúa chuyển gen
Ghi chú: A: vector chuyển gen pBIG-Ubi; giếng 4-19: các dòng lúa chuyển gen; B: Vector chuyển gen pBIG-Lip9; giếng 4-17: các dòng lúa chuyển gen; M: Thang chuẩn ADN 1 kb; giếng 1: Đối chứng âm; giếng 2: Đối chứng dương

3.2. Kết quả xác định số lượng bản sao các cây chuyển gen ở thế hệ T_0

Đã tiến hành xác định số lượng bản sao của cấu trúc chuyển gen trong 29 dòng lúa chuyển gen thu hạt bằng phản ứng qRT-PCR (PCR định lượng theo thời gian thực) với khuôn là ADN tổng số của các mẫu lá lúa có nồng độ 10 ng/ μ l. Phản ứng định lượng được tiến hành với môi được thiết kế trên gen

hygromyxin (*Hyg-RT-Fw* và *Hyg-RT-Rv*, bảng 2) và gen đối chứng (chưa được công bố - đang xin bản quyền) của Trung tâm Nghiên cứu Phát triển Nông nghiệp Quốc tế Pháp. Hàm lượng gen chuyển được so sánh gián tiếp thông qua so sánh hàm lượng gen đối chứng (gen đã được chứng minh chỉ có tồn tại đơn bản trong hệ gen lúa).

Bảng 3. Kết quả xác định số lượng bản sao các cây lúa chuyển gen ở thế hệ T₀

Cấu trúc gen chuyển	PCR dương tính	Số bản sao qRT-PCR	
		1 bản sao	> 1 bản sao
Lip9: MtOsDREB1	10	5	5
Ubi: MtOsDREB1A	9	4	5
pBIG-Lip9	6	5	1
pBIG-Ubi	4	3	1
Tổng	29	17	12

Về nguyên tắc, cả hai cặp môi thiết kế cho hygromyxin và gen đối chứng đều cho hiệu suất nhân bản tương đương nhau và gần bằng 1 (1,002 và 1,003), ngoài ra, mức độ liên hệ tuyến tính phải chặt chẽ. Kết quả thí nghiệm cho thấy, phản ứng định lượng PCR với gen *MtOsDREB1A* đáp ứng được các nguyên tắc trên và có hệ số quy đổi $2^{\Delta Ct}$ 0,4 - 1,12, trong đó 17 dòng lúa có $2^{\Delta Ct}$ 0,4 đến 0,67 tương ứng với 1 bản sao (copy) và 12 dòng có $2^{\Delta Ct}$ 0,92 đến 1,12 tương ứng với hơn 1 bản sao (Bảng 3).



Hình 3. Kết quả xác định bản sao bằng southern blot
 Ghi chú: M: thang chuẩn ADN (roche); giếng 1-5: cây chuyển gen Lip9: MtOsDREB1A; giếng 6: cây chuyển gen vector trống; Giếng 8, 11: cây chuyển gen Ubi-MtOsDREB1A; Giếng 12: Đối chứng âm là cây không chuyển gen; Giếng 7: cây chuyển gen Ubi-OsDREB1A có số lượng bản sao ước tính bằng qRT-PCR lớn hơn 1

Để chứng minh kết quả xác định số lượng bản sao trong các cây lúa Chanh Trui chuyển gen bằng kỹ thuật qRT-PCR, đã sử dụng phương pháp Southern blot để xác định lại số lượng bản sao của các dòng lúa chuyển gen *MtOsDREB1A*. Chín dòng lúa mang 1 bản sao gen *MtOsDREB1A*; một dòng lúa mang 1 bản sao là vector trống (pBIG-Lip9) và

một dòng lúa mang hơn một bản sao gen *MtOsDREB1* đã xác định bằng phản ứng qRT-PCR được chọn để tiến hành thí nghiệm lai Southern blot. Kết quả thu được từ phép lai Southern phù hợp với kết quả đã quan sát được từ phương pháp qRT-PCR trước đó về số lượng bản sao trong các dòng thí nghiệm (Hình 3). Như vậy, sử dụng phương pháp qRT-PCR cho phép xác định được số lượng bản sao trong cây lúa chuyển gen. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã sử dụng phương pháp này để xác định số lượng bản sao trong các cây trồng chuyển gen ở lúa (Ahmad và cs, 2005; Zhang D., 2005), bông (Zhang D. và cs, 2011, 2013); đậu tương (Chu Y. và cs, 2013).

3.3. Kết quả sàng lọc và xác định các dòng lúa chuyển gen đồng hợp tử ở thế hệ T₁

Các hạt thu được từ cây T₀ hay còn gọi là hạt T₁ sẽ được đánh giá khả năng nảy mầm trên môi trường MS có bổ sung 50 mg/l hygromyxin, các hạt không mang gen kháng hygromyxin sẽ bị chết còn các hạt mang gen kháng hygromyxin sẽ nảy mầm. Do các cây T₀ mang một bản sao của cấu trúc chuyển gen ở thể dị hợp tử nên các cấu trúc chuyển gen trong các hạt T₁ thu được sẽ phân ly theo định luật 1 Mendel. Nghĩa là về mặt lý thuyết cây T₁ sẽ có tỷ lệ 1:2:1 về kiểu gen và 3:1 về kiểu hình. Kết quả chúng tôi thu được tỷ lệ hạt nảy mầm trên môi trường hygromyxin là 54/87 tương ứng với 62,07% (Bảng 4). Đáng chú ý là mặc dù tỷ lệ hạt nảy mầm theo lý thuyết là 3:1 nhưng con số thực tế thấp hơn chỉ đạt từ 57% đến 67% nhưng tất cả các cây sống sót trên môi trường chọn lọc đều có phản ứng dương tính trong thí nghiệm PCR với các cặp môi đặc hiệu (Bảng 4). Sự xuất hiện hạt T₁ không có khả năng nảy mầm trên môi trường chứa hygromyxin có thể do hai nguyên nhân chính: (i) sự phân ly độc lập và tổ hợp tự do theo định luật Mendel (cây lúa chuyển gen T₀ được cho tự thụ phân hoán toàn), (ii) vị trí của cấu trúc biểu hiện gen trong hệ gen cây chủ ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện của gen chuyển. Kết quả xác định tình trạng của 54 cây lúa chuyển gen ở bảng 4 cho thấy có 37 cây có tỷ số $NC=2^{\Delta Ct}$ dao động từ 0,38 đến 0,67 tương ứng với việc các cây này chỉ có 1 alen gen chuyển trong tế bào hay có kiểu gen dị hợp tử (tạm gọi Aa) và 17 cây T₁ có tỷ số NC dao động trong khoảng 0,9 đến 1,02 tương ứng với việc tồn tại đồng thời 2 alen gen chuyển trong các cây chuyển gen tạm gọi đồng hợp tử này (kiểu gen AA).

Bảng 4. Kết quả sàng lọc và xác định tình trạng đồng hợp các dòng T₁

		Số cây kiểm tra	Số hạt nảy mầm trên hygromyxin	PCR dương tính	Kiểu gen	
					Đi (Aa)	Đồng hợp (AA)
<i>Lip9: MtOsDREB1A</i>	L1	12	8	8	6	2
	L2	8	5	5	3	2
	L3	10	6	6	4	2
	L4	6	4	4	3	1
	L5	13	8	8	6	2
<i>Ubi: MtOsDREB1A</i>	U1	12	7	7	4	3
	U2	7	4	4	3	1
	U3	9	6	6	4	2
	U4	10	6	6	4	2
Tổng		87	54	54	37	47

Như vậy qua sàng lọc, đánh giá với các thí nghiệm qRT-PCR, lai Southern và đánh giá tỷ lệ nảy mầm trên hygromyxin và PCR thông thường đã thu được tổng số 17 cây chuyển gen đồng hợp ở thế hệ T₁ cho cả 2 công thức thí nghiệm (5 dòng *Lip9: MtOsDREB1A* và 4 dòng *Ubi: MtOsDREB1A*). Tiếp đó, 17 cây lúa non đồng hợp từ mang một bản sao (copy) cấu trúc chuyển gen đã được chuyển sang trồng trong điều kiện môi trường bình thường để tiếp tục phân tích đặc điểm kiểu hình.

4. KẾT LUẬN

Đã tạo thành công 19 dòng lúa chuyển gen mang gen *MtOsDREB1A* biểu hiện dưới sự điều khiển promoter Ubiquitin và Lip9 vào giống lúa Chanh Trụi, trong đó 10 dòng mang cấu trúc *Lip9: MtOsDREB1A* và 9 dòng mang cấu trúc *Ubi: MtOsDREB1A*.

Trong tổng số 19 dòng lúa chuyển gen ở thế hệ T₀, sử dụng kỹ thuật qRT-PCR đã xác định được 9 dòng mang một bản sao và 10 dòng mang hơn một bản sao (copy). Các dòng lúa chuyển gen mang 1 bản sao được khẳng định lại bằng kỹ thuật Southern blot cho thấy kỹ thuật qRT-PCR hoàn toàn chính xác trong việc xác định số bản sao trong các cây chuyển gen.

Đã xác định được 17 cây lúa đồng hợp từ từ 9 dòng lúa chuyển gen *MtOsDREB1A*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmad A., et al. (2005). Determination of cryIAb and cryIAc copy number in transgenic basmati 370 rice (*Oryza sativa* L.) plants using real-

time PCR and its comparison with Southern blot. J. Biol. Sci. 5: 283-288.

2. Bhatnagar-Mathur, P., et al. (2013). Transgenic peanut overexpressing the *DREB1A* transcription factor has higher yields under drought stress. Mol. Breed. 33,327-340.

3. Bray, E. A., et al. (2000). Responses to abiotic stress. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, eds B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones (Rockville: American Society of Plant Physiologists), 1158-1203.

4. Cao Lệ Quyên và cộng sự (2012). Thiết kế vector chuyển gen điều khiển *MtOsDREB1A* có tiềm năng tăng cường khả năng chịu điều kiện bất lợi ở lúa. Tạp chí Công nghệ Sinh học. Tập 10, số 2, trang: 271-279.

5. Cao Lệ Quyên và cộng sự (2009). Phân lập và chuyển gen điều khiển chịu hạn MtOsDREB2A vào giống lúa Chanh Trụi thông qua *Agrobacterium*. Tạp chí Sinh học. Tập 31, số 2, trang: 79-88.

6. Chu Y., et al. (2013). Improvement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) transformation efficiency and determination of transgene copy number by relative quantitative real-time PCR. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 49: 266-275.

7. Datta, K., et al. (2012). Overexpression of Arabidopsis and rice stress genes inducible transcription factor confers drought and salinity tolerance to rice. Plant Biotechnol. 10, 579-586.

8. De Paiva Rolla, A. A., et al. (2013). Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. Transgenic Res. 23, 75-87.

9. Hong, B., et al. (2006). Heterologous expression of the AtDREB1A gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. Sci. China C Life Sci. 49, 436-445.

10. Hsieh, T. H., et al. (2002a). Tomato plantsectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiol. 130, 618-626.

11. Hsieh, T. H., et al. (2002b). Heterologous expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. Plant Physiol. 129, 1086-1094.

12. Ito, Y., et al. (2006). Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved

incold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47, 141-153.

13. Iwaki, T., et al. (2013). Metabolic profiling of transgenic potato tubers expressing Arabidopsis dehydration response element-binding protein 1A (*DREB1A*). *J. Agric. Food Chem.* 61, 893-900.

14. Kasuga, M. et al. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17, 287-291.

15. Kasuga, M., et al. (2004). A combination of the Arabidopsis *DREB1A* gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45, 346-350.

16. Liu, Q., et al. (1998). Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression,

respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1391-1406.

17. Mizoi, J., et al. (2013). GmDREB2A a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is post translationally regulated and mediates dehydration-responsive element dependent gene expression. *Plant Physiol.* 161, 346-361.

18. Polizek, A. M., et al. (2011). Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:*AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genet. Mol. Res.* 10, 3641-3656.

19. Saint Pierre, C. et al. (2012). Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. *J. Exp. Bot.* 63, 1799-1808.

20. Zhang Y. W. et al. (2013). Overexpression of a novel CryII gene confers resistance to CryIa-resistant cotton bollworm in transgenic lines of maize. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 115:151-158.

TRANSFORMATION OF GENE ENCODING TRANSCRIPTION FACTOR *MtOsDREB1A* INVOLVED IN DROUGHT TOLERANCE INTO VIETNAMESE RICE VARIETY

Cao Lê Quyen¹, Tran Tuan Tu^{1,2}, Dinh Doan Long³, Pham Xuan Hoi¹

¹Genetic Agricultural Institute

²Institut de recherche pour le développement, France

³Vietnam National University Hanoi, School of Medicine and Pharmacy

Summary

Gene encoding *DREB1A* transcription factors from other plants, including *Arabidopsis*, corn, canola, barley, rice, tomato and wheat have been cloned and many studies proved expression of *DREB1A* increasing drought tolerance in transgenic plants. In a previous study, *MtOsDREB1A* gene was isolated and inserted into plant expression vector under the control of the ubiquitin promoter and *Lip9* (5). In this study, *MtOsDREB1A* was transferred into Chanh Trui variety for drought tolerance analysis of transgenic lines. As a results, we obtained 29 transgenic rice lines, including 17 lines carrying a copy, 12 lines carrying more than one copy, identified 17 homozygous transgenic plants from 9 transgenic lines. These homozygous transgenic plants are ready for drought tolerance analysis or transfer *MtOsDREB1A* in too ther varieties by traditional hybridization, to create rice varieties resistant to drought tolerant.

Keyword: Drought tolerance, quantitative RT-PCR, southern Blot, transgenic, transcription factor.

Người phản biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 18/12/2015

Ngày thông qua phản biện: 18/01/2016

Ngày duyệt đăng: 25/01/2016