

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH CHUYỂN GEN CHO GIỐNG LÚA TAICHUNG 65 THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Hoàng Thị Giang^{1*}, Mai Đức Chung¹, Nguyễn Thị Huệ¹, Jérémy Lavarenne³,
Mathieu Gonin³, Nguyễn Thanh Hải², Đỗ Năng Vịnh¹, Pascal Gantet³

¹*Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam;* ²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam;*
³*IRD, UMR DIADE, LMI RICE*

Email*: nuocngamos@yahoo.com

Ngày gửi bài: 16.10.2014

Ngày chấp nhận: 22.07.2015

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã cải tiến thành công quy trình chuyển gen vào giống lúa Taichung 65 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* với hiệu suất chuyển gen cao, thao tác đơn giản, giảm thiểu khối lượng công việc phải làm. Trong quy trình đưa ra, chúng tôi đã tối ưu hóa các bước tiến hành, chuẩn hóa thành phần môi trường nuôi cấy và đưa ra một số nhân tố quan trọng trong thao tác. Kết quả thí nghiệm cho thấy sử dụng đĩa petri có gờ cao 15mm và phơi mẫu không chỉ làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo từ phơi mà còn tăng kích thước và chất lượng mô sẹo dùng cho quá trình chuyển gen. Dịch khuẩn với mật độ OD_{600nm} = 0,1 là tối ưu với tần số biểu hiện gen GUS ở mô sẹo cao (81,25%) và tỷ lệ mẫu nhiễm thấp. Ở giai đoạn chọn lọc sau lây nhiễm, mô sẹo phát triển tốt hơn khi tiến hành phơi mẫu và sử dụng đĩa petri có gờ cao 15mm. Phân tích sự có mặt của promoter R4 cho thấy tỷ lệ cây tái sinh mang cấu trúc gen biến nạp cao (90,24%). Đánh giá sự biểu hiện của gen GUS ở cây lúa chuyển gen đã chứng tỏ sự hoạt động mạnh của promoter R4, điều khiển quá trình phiên mã, dẫn tới tổng hợp enzym GUS. Kết quả phân tích cây chuyển gen ở thế hệ T1 đã chứng minh sự di truyền ổn định của gen biến nạp sang thế hệ sau.

Từ khóa: *Agrobacterium*, callus phơi hóa chuyển gen, japonica, lúa, Taichung 65.

Optimization of Transformation Protocol for Japonica Rice cv.Taichung 65 through *Agrobacterium tumefaciens*

ABSTRACT

In the present study, we have successfully developed a transformation protocol for a rice variety Taichung 65 mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with high efficiency, easy manipulation and reduction in labour work. In the protocol, we have optimized all steps of transformation, standardized components of culture media and presented several manipulation experiments. Experimental results have shown that using petri dishes with high edge (15 mm) and exposing explants not only increased the rate of callus formation, but also enhanced the size and quality of calluses. Using bacterial suspension at density OD_{600nm} = 0.1 was optimal with high GUS expression in callus (81.25%) and low contamination. During the selection phase, transformed calluses grew better in petri dishes with high edge (15 mm) and exposing explants. Checking for the presence of R4 promoter at the molecular level showed high frequency of regenerated plantlets carrying the transgenes (up to 90.24%). GUS expression in different tissues of transgenic plants indicated the high activity of promoter R4, leading to initiate transcription and synthesis of GUS enzyme. Analysis of T1 plants confirmed the stable inheritance of transgene to the next generation.

Keywords: *Agrobacterium*, callus. Rice, embryogenic. japonica, Taichung 65, transformation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa (*Oryza sativa*) là một trong những cây lương thực chính của Việt Nam. Hiện nay,

trên thế giới việc xác định chức năng gen ở cây lúa rất được chú trọng và giữ một vai trò quan trọng trong nghiên cứu cơ bản cũng như nghiên

cứu ứng dụng. Bằng phương pháp nghiên cứu chức năng gen có thể khám phá ra được các gen kiểm soát những đặc điểm nông sinh học quan trọng như năng suất, chất lượng hạt, tính chống chịu stress sinh học và phi sinh học, hiệu quả sử dụng dinh dưỡng. Thành công trong kỹ thuật chuyển gen lúa mở đường cho việc nghiên cứu chức năng gen theo các hướng: gây bất hoạt gen, gây siêu biểu hiện gen và đánh giá mức độ hoạt động của promoter thông qua biểu hiện của gen chỉ thị.

Trước đây, phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* không được xem là có hiệu quả với cây một lá mầm (Raineri et al., 1990; Gould et al., 1991). Nhưng trong những năm gần đây có nhiều công trình nghiên cứu báo cáo việc biến nạp gen thành công vào lúa nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*. Chan et al. (1992) là những người đầu tiên chuyển gen vào callus lúa mặc dù khi đó không thu được cây chuyển gen. Đến năm 1993, nhóm nghiên cứu này đã thu được cây lúa japonica chuyển gen đầu tiên nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng cách nuôi cấy phôi non. Hiện nay, phương pháp biến nạp gen vào lúa nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* là phương pháp được lựa chọn sử dụng hơn cả, do số bản sao của gen biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ thấp, bền vững (Hiei et al., 2008). Đặc biệt, phương pháp này cho hiệu quả chuyển gen cao, khả năng chuyển được đoạn ADN có kích thước lớn và chi phí thấp.

Một trong những công trình nghiên cứu đánh dấu bước tiến bộ quan trọng trong kỹ thuật chuyển gen lúa sử dụng *A. tumefaciens* là công trình của Hiei et al. (1994). Nhóm nghiên cứu này đã xây dựng được quy trình chuyển gen hiệu quả cho một số giống lúa nhóm japonica như Tsukinohikari, Asanohikari và Koshihikari. Từ đó, kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi và cải tiến ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới.

Giống lúa Taichung 65 được xem là giống mô hình đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu về di truyền ở cây lúa. Cho đến nay đã có nhiều thể đột biến phục vụ nghiên cứu được phát triển trên nền di truyền của Taichung 65 như: các thể đột biến phôi nhỏ *re* (Hong et al., 1996), các thể đột biến phôi lớn *ge* (Hong et al.,

1996), các thể đột biến không có chồi *shl* (Sato et al., 1999); các thể đột biến không có rễ bên *lrt*, một số thể đột biến không có rễ bất định *crl* (Inukai et al., 2005), thể đột biến không có rễ mầm *ral* (Enrico et al., 2003),... Do các thể đột biến này đều có chung nền di truyền với giống lúa Taichung 65, nên việc xây dựng một quy trình chuyển gen hiệu quả áp dụng cho Taichung 65 là đặc biệt quan trọng cho các nghiên cứu gen dựa trên những thể đột biến này, góp phần thúc đẩy quá trình nghiên cứu cơ bản và ứng dụng ở lúa.

Trong nghiên cứu biến nạp gen vào Taichung 65 từ callus phôi hóa, nhóm nghiên cứu của Yara et al. (2001) đã sử dụng nền môi trường cơ bản N6 cho nuôi cấy và đạt được tỷ lệ chuyển gen là 4,6%. Mới đây, Chopita et al. (2014) đã công bố nghiên cứu về chức năng của gen OSB2 liên quan đến sự điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin ở cây lúa bằng cách gây siêu biểu hiện gen OSB2 trong giống Taichung 65. Nhóm nghiên cứu cũng đã áp dụng phương pháp biến nạp thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* từ callus phôi hóa và chọn lọc callus chuyển gen lần lượt trên hai môi trường dinh dưỡng có bổ sung hygromycin với lượng tăng từ 15 - 30 mg/l, cho tỷ lệ mẫu callus biểu hiện gen GUS 7,59%

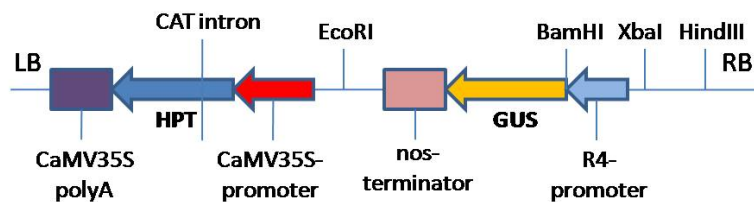
Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu cải tiến quy trình chuyển gen mang lại hiệu quả cao thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* áp dụng cho các giống lúa thuộc nhóm japonica.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Hạt thóc của giống lúa japonica Taichung 65 được bóc vỏ, khử trùng và cấy lên môi trường tạo mô sẹo có chứa 2,5 mg/l 2,4-D. Mô sẹo phôi hóa của các giống lúa này được sử dụng làm vật liệu trực tiếp cho chuyển gen.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAMBIA5300 GUS TNOS R4 (Hình 1) gắn gen chỉ thị GUS dưới sự điều khiển của promoter R4 (Nodulin MtN3 family protein) được sử dụng để biến nạp.



Hình 1. Sơ đồ T-DNA của plasmid pCAMBIA5300 GUS TNOS R4

2.2. Phương pháp

Chúng tôi tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu trên cơ sở áp dụng quy trình của Hiei et al. (1994) do nhóm Harry (nhóm nghiên cứu lúa, trường Đại học Leiden, Hà Lan) và nhóm Guiderdoni E. (CIRAD, Montpellier, Pháp) cải tiến năm 1998. Quy trình chuyển gen gồm các bước sau (Hình 2):

2.2.1. Tạo mô sẹo

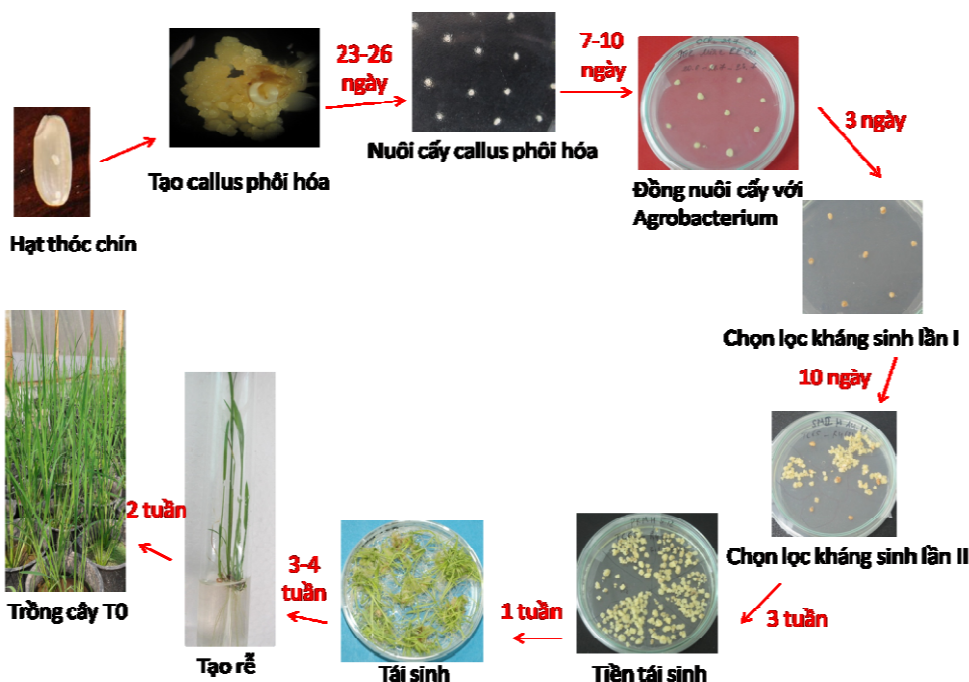
Hạt thóc được bóc vỏ, sau khi khử trùng cấy lên bề mặt thạch của đĩa môi trường tạo callus (NB-IND + 2,5 mg/l 2,4-D) - 10 hạt/đĩa, nuôi trong tối ở 28°C. Sau 23 - 26 ngày nhận những callus phát sinh từ phôi chuyển sang môi trường tạo callus mới. Sau 7 - 10 ngày chọn những

callus rắn chắc đạt kích thước 3 - 5mm, màu hơi vàng, có hình cầu để làm vật liệu chuyển gen.

Để xác định được điều kiện tối ưu cho việc tạo callus chúng tôi tiến hành nuôi cấy hạt lúa Taichung 65 với 3 công thức: sử dụng đĩa petri thường (90 x 100mm); sử dụng đĩa petri có gờ cao (90 x 150mm); sử dụng đĩa petri có gờ cao kết hợp mở đĩa trong khoảng 15 phút cho bay hết lượng nước dư ngay sau khi cấy hạt lên bề mặt môi trường. Sau 3 tuần nuôi cấy đánh giá khả năng tạo callus từ phôi.

2.2.2. Lây nhiễm

Chuẩn bị trước vi khuẩn để chuyển gen, nuôi cấy trên đĩa môi trường AB đã bổ sung kanamycin



Hình 2. Sơ đồ quá trình chuyển gen vào lúa japonica thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

50 mg/l và rifampicin 25 mg/l. Nuôi 3 ngày ở nhiệt độ 28°C. Tiến hành thí nghiệm nghiên cứu với 4 mật độ OD_{600nm} khác nhau của vi khuẩn: 0,01; 0,1; 0,5; 1. Dùng dao cấy đã khử trùng gạt lấy lớp vi khuẩn, hòa vào dịch môi trường nuôi cấy lỏng (R2-CL + 2,5 mg/l 2,4-D) có bổ sung acetosyringone 100µM. Đổ dịch khuẩn vào đĩa petri callus đã thu, sau 10 - 15 phút đổ dịch khuẩn đi. Tiếp theo, chuyển callus sang giấy thấm, thấm khô callus bằng giấy thấm đã khử trùng và cấy callus lên môi trường đồng nuôi cấy đặc (R2-CS + 2,5 mg/l 2,4-D). Nuôi 3 ngày trong tối ở nhiệt độ 25°C.

2.2.3. Chọn lọc callus bằng kháng sinh

Chuyển mẫu từ môi trường đồng nuôi cấy sang môi trường chọn lọc I (R2-S + 2,5 mg/l 2,4-D) có bổ sung kháng sinh 400 mg/l cefotaxime, 100 mg/l vancomycin và 50 mg/l hygromycin. Nuôi trong tối 10 ngày ở 28°C. Chọn những callus kháng kháng sinh chuyển sang môi trường chọn lọc II (NB-S + 2,5 mg/l 2,4-D) với lượng kháng sinh bổ sung tương tự và nuôi trong tối 3 tuần ở 28°C. Sau khi cấy chuyển 10 ngày nhặt những callus mới phát sinh cấy xuống môi trường xung quanh callus gốc để tăng hiệu quả chọn lọc.

2.2.4. Tái sinh cây hoàn chỉnh

Chuyển những callus mới phát sinh sang môi trường tiền tái sinh bổ sung 5 mg/l ABA, 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA và lượng kháng sinh như môi trường chọn lọc. Nuôi trong tối ở 28°C một tuần. Sau một tuần chọn những callus rắn chắc kháng kháng sinh từ môi trường tiền tái sinh cấy sang môi trường tái sinh (4 - 6 callus mới/1đĩa petri/1 callus ban đầu). Nuôi cấy trong phòng nuôi với thời gian chiếu sáng 12h sáng/12h tối, nhiệt độ phòng 26 - 28°C.

Sau 3 - 4 tuần khi chồi mới phát sinh đạt khoảng 3cm, chuyển sang môi trường tạo rễ, mỗi đĩa petri lấy một chồi tái sinh. Khi cây phát triển tới hạn thì dùng dao cấy cắt ngang cây và rễ, cấy phần gốc vào môi trường tạo rễ mới. Lá cây đã cắt dùng để kiểm tra hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp PCR.

2.2.5. Phân tích sự có mặt của gen biến nạp bằng phương pháp PCR

ADN tổng số từ lá cây lúa chuyển gen được tách chiết theo phương pháp Xin Xu et al. (2005) có cải tiến và sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu nhằm xác định đồng thời sự có mặt của promoter R4 và gen GUS trong các dòng lúa chuyển gen. Cặp môi sử dụng là PG-R4_P_F (5'-AAGCTTCGAGCTGGT GGAAAGATTTTTGC-3') và PCGUS_R (5'-CG CGATCCAGACTGAATGCC-3').

Thực hiện phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt như sau: 94°C trong 4 phút; 30 chu kỳ (94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút); 72°C trong 4 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%, nhuộm với ethidium bromide rồi quan sát bằng ADN dưới đèn UV.

2.2.6. Xác định sự biểu hiện của gen gus bằng phương pháp nhuộm mô

Ngâm 5 mẫu callus ở giai đoạn tái sinh và 5 dòng lúa chuyển gen thế hệ T0 trong dung dịch X-gluc và ủ trong tủ ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C, thời gian ủ từ 24 - 48 giờ. Sau thời gian ủ, mẫu được rửa sạch bằng nước cất khử trùng và ngâm vào dung dịch cồn nhằm loại bỏ điệp lục. Sau khi loại bỏ điệp lục, đưa lên kính hiển vi soi nổi quan sát và chụp ảnh.

2.2.7. Phân tích sự di truyền của gen biến nạp ở thế hệ T1

Chọn ngẫu nhiên 5 dòng chuyển gen để phân tích sự di truyền của cấu trúc gen biến nạp ở thế hệ T1 bằng phương pháp PCR và nhuộm mô. Với mỗi dòng chuyển gen đem gieo 20-25 hạt và trồng trong môi trường thủy canh. Sau 3 tuần lấy số cây để phân tích PCR và số cây để phân tích biểu hiện của gen GUS. Sau đó đánh giá tỷ lệ phân ly di truyền của gen biến nạp theo phương pháp phân phối χ^2 .

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy tạo callus phân hóa

Khi áp dụng theo đúng quy trình biến nạp đã cải tiến của nhóm Guiderdoni, chúng tôi

nhận thấy callus phát sinh từ phôi có kích thước nhỏ và vón thành một khối chai cứng, một số bị mềm nhũn do hấp thu nhiều nước. Việc tạo được callus với kết cấu tối rắn để làm vật liệu chuyển gen là rất quan trọng, ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả chuyển gen sau này. Chính vì vậy, cần phải chọn được môi trường nuôi cấy thích hợp. Đối với hầu hết các giống lúa japonica thì nên môi trường NB cải tiến có bổ sung 2,5 mg/l 2,4-D thích hợp nhất để tạo callus từ phôi hạt lúa chín. Mặc dù vậy, chất lượng callus hình thành còn phụ thuộc nhiều vào các thao tác thí nghiệm và điều kiện nuôi cấy.

Số liệu ở bảng 1 cho thấy sau 3 tuần nuôi cấy trên cả 3 công thức nghiên cứu đều cho tỷ lệ mẫu phát triển mô sẹo từ phôi tương đối cao, đặc biệt khi sử dụng đĩa petri có gờ cao tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 98,3 - 98,7%. Tuy nhiên, trong các công thức thí nghiệm kích thước khối callus và kết cấu của callus lại rất khác nhau. Trong đĩa petri thường hạt lúa Taichung 65 phát sinh callus rất nhỏ (2,8mm) và chai rắn,

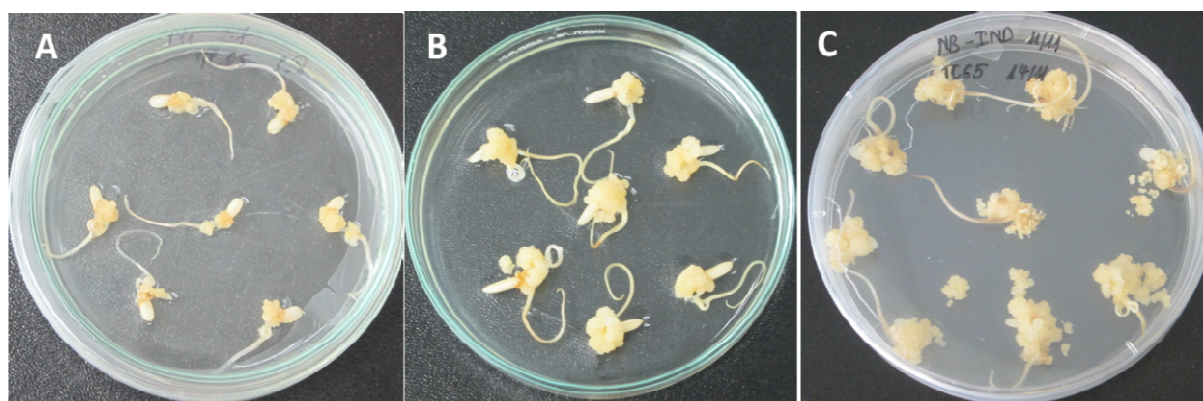
khó tách được callus đơn để làm vật liệu chuyển gen (Hình 3A). Trong đĩa petri có gờ cao mô sẹo hình thành với kích thước lớn hơn (5,0mm), mức độ tối vừa phải, số lượng callus riêng lẻ có thể chọn chưa nhiều (Hình 3B). Với thí nghiệm sử dụng đĩa petri có gờ cao 15mm kết hợp phôi mẫu thì quan sát thấy callus tạo thành rất tối dẫn đến làm tăng kích thước khối callus (7,2mm), sau 3 tuần nuôi cấy từng callus nhỏ tự bung ra khỏi khối callus phôi hóa (Hình 3C).

Sử dụng đĩa petri có gờ cao đã làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo từ phôi tuy không nhiều nhưng kích thước của mô sẹo tăng lên 1,78 lần so với sử dụng đĩa petri thông thường. Đặc biệt hơn khi kết hợp sử dụng đĩa petri gờ cao 15mm và phôi mẫu thì ngoài sự tăng lên về tỷ lệ tạo mô sẹo, kích thước mô sẹo cũng tăng tới 2,57 lần và chất lượng của mô sẹo cũng tốt hơn nhiều so với sử dụng đĩa petri thông thường. Do đó, chúng tôi sử dụng đĩa petri gờ cao 15mm và phôi mẫu để tạo mô sẹo từ phôi, tạo vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo callus phôi hóa

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu tạo callus hôi hóa (%)	Kích thước khối allus (mm)	Loại callus (1-3 điểm*)
Đĩa petri thường	93,7	2,8	3
Đĩa petri có gờ cao	98,3	5,0	2
Đĩa petri có gờ cao + phôi mẫu	98,7	7,2	1

Ghi chú: (*) 1 điểm - rất tối, 2 điểm - tối vừa phải, 3 điểm - chai, rắn.



Hình 3. Phát sinh mô sẹo phôi hóa

Ghi chú: A: Đĩa petri thường; B: Đĩa petri có gờ cao; C: Đĩa petri có gờ cao kết hợp phôi mẫu

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn lây nhiễm

Một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* chính là mật độ của vi khuẩn khi lây nhiễm. Mật độ vi khuẩn là số tế bào vi khuẩn trong một đơn vị thể tích. Lượng tế bào vi khuẩn quá thấp sẽ làm giảm hiệu quả tiếp xúc của vi khuẩn với các mẫu thực vật, khi mật độ vi khuẩn quá cao làm ảnh hưởng tới sự phát triển của mẫu thực vật và gây nhiễm mẫu ở giai đoạn đồng nuôi cấy. Guiderdoni et al. (1998) đã sử dụng dịch vi khuẩn với $OD_{600nm} = 1,0$ để lây nhiễm với callus phôi hóa của các giống lúa japonica. Trong nghiên cứu của mình, Ratnayake và Hettiarachchi (2010) cũng sử dụng dịch khuẩn GV3101 với mật độ $OD_{600nm} = 1,0$ để lây nhiễm với callus giống lúa Sri Lanka. Do đó, bước đầu nghiên cứu chúng tôi cũng tiến hành thí nghiệm lây nhiễm callus với mật độ vi khuẩn $OD_{600nm} = 1,0$ và nhận thấy tỷ lệ callus bị nhiễm vi khuẩn khá cao, thậm chí khi chuyển callus sang môi trường chọn lọc II vi khuẩn vẫn phát triển mạnh trên nhiều callus. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm để xác định mật độ vi khuẩn thích hợp nhất cho quá trình biến nạp.

Chúng tôi bố trí 4 công thức thí nghiệm chuyển gen với các mật độ OD_{600nm} khác nhau của chủng vi khuẩn EHA 105: 0,01; 0,1; 0,5; 1. Sau 2 tuần tiến hành đánh giá biểu hiện của gen gus bằng cách nhuộm mẫu trong dung dịch X-gluc. Kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ vi khuẩn ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu bị nhiễm cũng như tần số chuyển gen (Bảng 2).

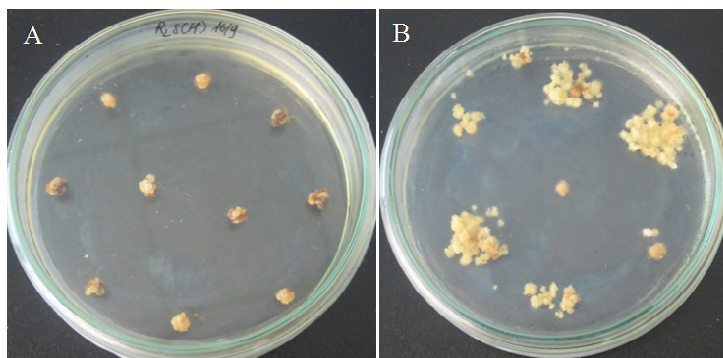
Ở các thí nghiệm với mật độ quang của dịch khuẩn 0,5 và 1, sau 3 ngày đồng nuôi cấy quan sát thấy vi khuẩn bắt đầu phát triển mạnh xung quanh mẫu callus. Sau 2 tuần trên môi trường chọn lọc, tỷ lệ mẫu bị nhiễm khá cao (31,25 - 46,75%) và xung quanh các callus bị nhiễm xuất hiện dịch nhầy trắng đục. Tần số biểu hiện gen gus ở hai công thức này lần lượt là 40,0% và 36,36%. Đánh giá thấy với OD dưới 0,1 thì 100% callus sạch không bị nhiễm khuẩn sau giai đoạn đồng nuôi cấy. Tuy nhiên, ở mật độ 0,01 hiệu quả biến nạp tương đối thấp (28,75%). Với nồng độ dịch khuẩn 0,1 tần số biểu hiện gen GUS tốt nhất trong các công thức thí nghiệm (81,25%).

3.3. Hiệu quả kháng kháng sinh

Các môi trường chọn lọc được bổ sung kháng sinh cefotaxime (400 mg/l) và vancomycin (100 mg/l) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. Đối với vector pCAMBIA5300 kháng sinh dùng để chọn lọc callus mang gen đích là hygromycin. Trong môi trường chọn lọc được bổ sung 50 mg/l hygromycin, các mẫu callus không kháng kháng sinh dần chuyển sang màu nâu đen, còn các callus kháng kháng sinh bắt đầu phát sinh callus mới trên bề mặt sau khoảng 1 tuần (Hình 4). Tỷ lệ callus kháng kháng sinh và phát triển callus mới dao động từ 80 - 90%. Tương tự như giai đoạn nuôi cấy tạo callus chuyển gen, để callus mới phát sinh tốt trong giai đoạn chọn lọc kháng sinh nên dùng đĩa petri với gờ cao (15mm) và để mở đĩa petri trong 15 phút sau mỗi lần chuyển callus sang môi trường mới.

Bảng 2. Ảnh hưởng của mật độ quang của vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen vào callus lúa

OD_{600}	Tổng số mẫu biến nạp	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Số mẫu biểu hiện gen GUS	Tần số biểu hiện gen GUS (%)
0,01	80	0	0	23	28,75
0,1	80	0	0	65	81,25
0,5	80	25	31,25	32	40,0
1	77	36	46,75	28	36,36



Hình 4. Chọn lọc callus trên môi trường chứa kháng sinh

Ghi chú: A: Môi trường chọn lọc I, B: Môi trường chọn lọc II

3.4. Hiệu quả tái sinh mô sẹo

Các giống lúa japonica được đánh giá là rất dễ tái sinh. Theo quy trình cải tiến chúng tôi áp dụng, quá trình tái sinh được chia làm hai giai đoạn: tiên tái sinh và tái sinh cây hoàn chỉnh. Môi trường nuôi cấy cho giai đoạn tiên tái sinh sử dụng thành phần dinh dưỡng NB và bổ sung 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 5 mg/l ABA, nuôi cấy 1 tuần trong tối để tăng cường khả năng phân hóa của tế bào (Hình 5A). Sau 1 tuần chuyển callus sang môi trường tái sinh RN với nền môi trường NB, bổ sung 3 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA. Tỷ lệ tái sinh đạt 100% với hệ số tái sinh từ callus rất cao (Hình 5B, 5C).

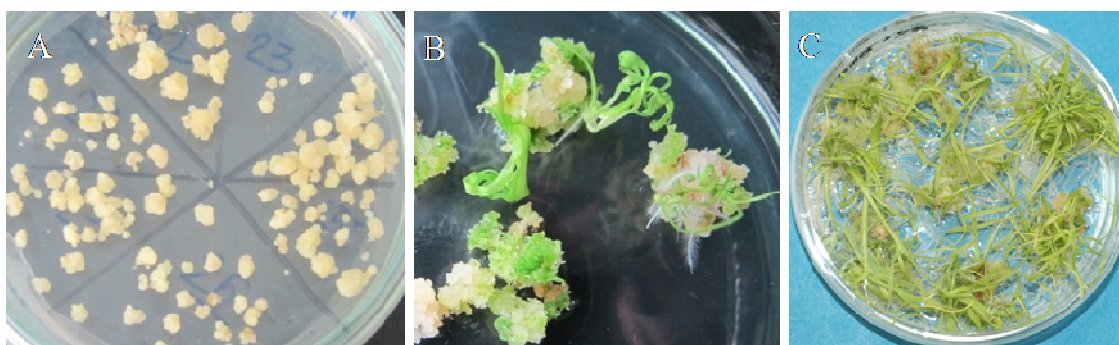
3.5. Đánh giá sự có mặt của promoter R4 và gen GUS ở mức độ phân tử

Kết quả kiểm tra mẫu ADN của 41 cây tái sinh cho thấy 37/41 mẫu có vạch đặc trưng ở vị trí khoảng 1kb tương tự như vị trí của mẫu đối chứng dương là plasmid pCAMBIA GUS TNOS

R4, trong khi đó, ở cây lúa đối chứng âm không có sự xuất hiện của vạch băng DNA này (Hình 5). Như vậy có thể nói rằng ở mức độ phân tử promoter R4 và gen GUS đã được chuyển thành công vào cây lúa, tỷ lệ cây tái sinh mang cấu trúc gen R4::GUS đạt 90,24%.

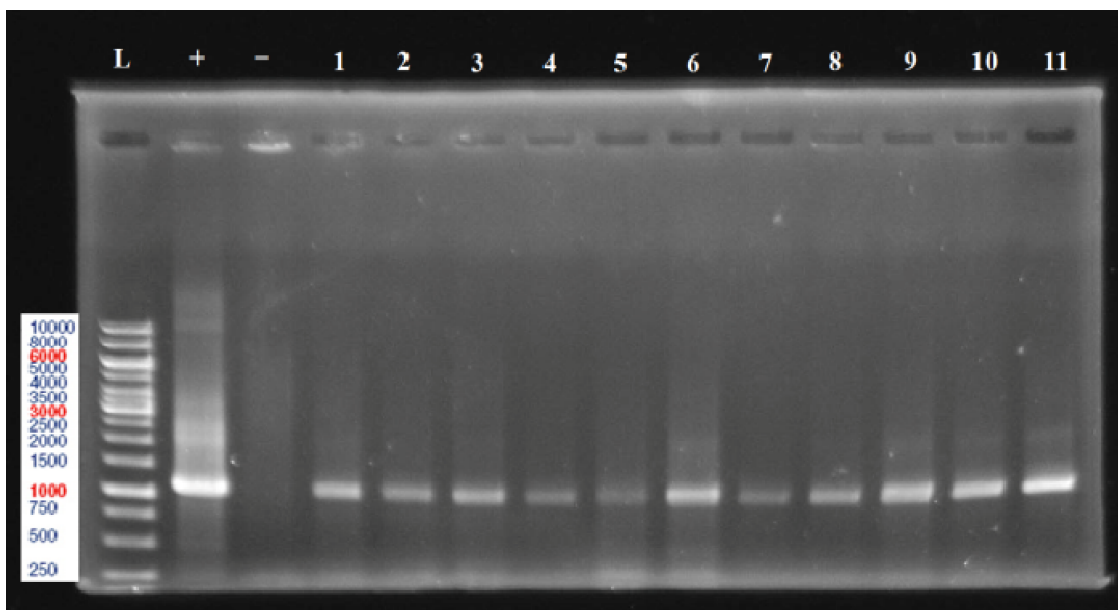
3.6. Đánh giá sự biểu hiện của gen GUS ở cây lúa chuyển gen

Kết quả nhuộm mẫu chuyển gen bằng X-gluc cho thấy ở cả 5 callus đang tái sinh và 5 cây chuyển gen đều xuất hiện màu xanh đặc trưng (Hình 6). Quan sát mức độ bắt màu chúng tôi nhận thấy ở các bộ phận lá và rễ màu xanh rất đậm, tuy nhiên trên thân cây mức độ biểu hiện GUS yếu hơn. Điều này có thể liên quan đến bản chất của promoter R4 đặc hiệu ở một số mô, cơ quan nhất định. Kết quả đánh giá đã chứng tỏ sự hoạt động mạnh của promoter R4, điều khiển quá trình phiên mã, dẫn tới tổng hợp protein GUS.



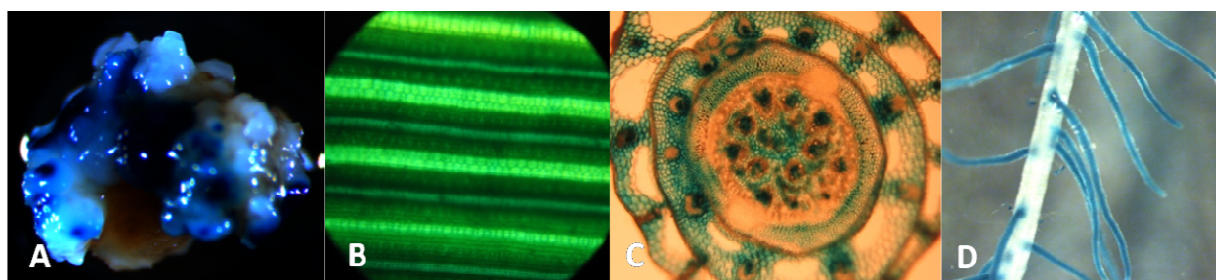
Hình 5. Quá trình tái sinh mô sẹo

Ghi chú: A.- Giai đoạn tiên tái sinh; B. Giai đoạn 2 tuần trên môi trường tái sinh; C. Giai đoạn 4 tuần trên môi trường tái sinh



Hình 5. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của promoter R4 và gen gus

Ghi chú: L: Thang DNA; "+": Plasmid pCAMBIA GUS TNOS R4; "-": DNA của cây lúa Taichung 65 không chuyển gen; 1 - 10: DNA của các cây chuyển gen.



Hình 6. Kết quả phân tích biểu hiện của gen gus

Ghi chú: A. Callus chuyển gen, B. Lá, C. Gốc thân, D. Rễ

3.7. Đánh giá tính ổn định di truyền của gen biến nạp

Để đánh giá tính ổn định di truyền của cấu trúc gen biến nạp sang thế hệ sau, chúng tôi tiến hành phân tích sự có mặt của cấu trúc gen biến nạp R4::GUS và sự biểu hiện của gen GUS ở các cây thế hệ T1 3 tuần tuổi (Bảng 3). Kết quả phân tích cho thấy các dòng #1, #2, #4 và #5 có giá trị χ^2 nhỏ hơn giá trị $\chi^2_{lý thuyết}$ (3,84), chứng minh các dòng này có tỷ lệ phân ly cấu trúc gen biến nạp gần đúng với tỷ lệ phân ly theo lý thuyết (3:1). Đối với dòng #3, từ số liệu phân tích

tích bằng PCR thấy rằng cấu trúc gen biến nạp được chèn vào genome và di truyền với tỷ lệ phân ly gần đúng với tỷ lệ 3:1 ($\chi^2 = 0,10$). Tuy nhiên không quan sát thấy hiện tượng bất màu của protein GUS ở các cây T1 của dòng này. Nguyên nhân có thể giải thích là do vị trí chèn của gen biến nạp trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ khiến promoter R4 không hoạt động. Như vậy, kết quả nghiên cứu đã chứng minh sự di truyền ổn định của cấu trúc gen R4::GUS sang thế hệ sau và chúng tôi đã chọn được các dòng: #1, #2, #4, #5.

Bảng 3. Đánh giá sự phân ly di truyền của cấu trúc gen biến nạp ở thế hệ T1

Dòng chuyển gen	Số cây T1	Số cây biểu hiện gen gus/Tổng số cây phân tích	Số cây "+" PCR/Tổng số cây phân tích	Tỷ lệ cây T1 "+" (%)	Tỷ lệ cây "+"/"-"	χ^2
#1	20	8/10	4/10	60,0	3:1	2,40
#2	20	8/9	7/11	75,0	3:1	0
#3	21	0/10	8/11	-	-	-
#4	18	7/9	6/9	72,22	3:1	0,07
#5	20	9/10	7/10	80,0	3:1	0,27

Các kết quả ở trên đã khẳng định thành công của việc cải tiến quy trình chuyển gen cho giống lúa japonica Taichung 65 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Chúng tôi áp dụng quy trình chuyển gen sau khi cải tiến cho các giống lúa japonica J02 và Nipponbare cũng thu được kết quả tương tự.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy với việc sử dụng đĩa petri gờ cao 15mm kết hợp với phôi mẫu không chỉ làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo từ phôi mà còn tăng kích thước và chất lượng mô sẹo dùng làm vật liệu cho chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*. Khi giảm mật độ OD_{600nm} của vi khuẩn từ 1,0 xuống 0,1 đã khắc phục được hiện tượng mẫu callus bị nhiễm khuẩn, trong khi vẫn đảm bảo được hiệu quả chuyển gen cao với > 80% số mẫu cấy biểu hiện gen GUS sau 10 ngày biến nạp và ~90% số cây tái sinh mang cấu trúc gen R4::GUS. Phân tích cây con thế hệ T1 chứng tỏ rằng đa số các dòng chuyển gen đều mang 1 locus gen (tỷ lệ phân ly 3:1) và thể hiện sự di truyền ổn định của cấu trúc gen biến nạp cho thế hệ sau. So sánh với kết quả nghiên cứu của Hiei et al. (1994), hiệu quả chuyển gen ở một số giống lúa japonica khi đó mới chỉ đạt 23%. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của nhóm này cũng cho thấy số bản copy gen trong tế bào cây chuyển gen lớn, dao động từ 1 - 6 và một số dòng chuyển gen chỉ biểu hiện gen hpt hoặc GUS.

Như vậy, với quy trình cải tiến này, chúng tôi đã đạt được một bước tiến đáng kể trong việc tăng cường hiệu quả chuyển gen vào giống lúa

japonica Taichung 65, đặc biệt là giảm thiểu khối lượng công việc cần thao tác trong mỗi công thức biến nạp. Với mỗi công thức chỉ cần sử dụng 40 - 50 callus làm vật liệu, tương đương với 4 - 5 đĩa petri, do đó có thể thực hiện đồng thời nhiều công thức biến nạp một lúc. Chúng tôi áp dụng quy trình chuyển gen sau khi cải tiến cho các giống lúa japonica J02 và Nipponbare cũng thu được kết quả tương tự.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ dự án “Nghiên cứu chức năng gen quy định phát triển bộ rễ lúa, phục vụ công tác chọn tạo giống lúa chịu hạn bằng công nghệ gen” dưới sự hướng dẫn của GS. Đỗ Năng Vịnh (Viện Di truyền Nông nghiệp) và GS. Pascal Gantet (Viện Nghiên cứu Phát triển IRD, Pháp).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chan M.T., Lee T.M., Chang H.H. (1992). Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.*, 33: 577-583.
- Chopita Sakulsingharoj, Poonsri Inta, Roypim Sukkasem, Saengtong Pongjaroenkit, Srimek Chowpongpan, Varaporn Sangtong (2014). Overexpression of OSB2 gene in transgenic rice up-regulated expression of structural genes in anthocyanin biosynthesis pathway. *Thai J. Genet.*, 7(3): 173-182.
- Enrico Scarpella, Saskia Rueb and Annemarie H. Meijer (2003). The *RADICLELESS1* gene is required for vascular pattern formation in rice. *Development*, 130: 645-658.
- Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E.C., Peterson G., Smith R.H. (1991). Transformation of

- Zea mays L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.*, 95: 426-434.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Hiei Y., Komari T. (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protocols*, 3: 824-834.
- Hong S.K., Kitano H., Satoh H., Nagato Y (1996). How is embryo size genetically regulated in rice? *Development*, 122: 2051-2058.
- Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi-Tanaka M., Shibata Y., Gomi K., Umemura, I., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H., and Matsuoka M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell*, 17: 1387-1396.
- Peng J. Kononowicz H., Hodges T. K. (1992). Transgenic indica rice plants *Theor. Appl. Genet.*, 83: 855-863.
- Rainieri D.M., Bottino P., Gordon M.P., Nester, E.W. (1990). *Agrobacterium* mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotech.*, 8: 33-38.
- Satoh H., Hong S.K., Nishimura A., Matsuoka M., Kitano H., Nagato Y. (1999). Initiation of shoot apical meristem in rice: characterization of four SHOOTLESS genes. *Development*, 126: 3629-3636.
- Xin X., Shinji K, Tatsuhito F., Chuntai W. (2005). A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 23: 291-295.
- Yara Asanori, Otani Motoyasu, Kusumi Kensuke, Matsuda Osamu, Shimada Takiko, Iba Koh (2001). Production of transgenic japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar, Taichung 65, by the *Agrobacterium*-mediated method. *Plant Biotechnology*, 18(4): 305-310.