

# XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG BẢN COPY VÀ THỂ ĐỒNG HỢP TỬ Ở CÂY LÚA CHUYỂN GEN *OsNAC1* BẰNG KỸ THUẬT PCR ĐỊNH LƯỢNG THỜI GIAN THỰC

Cao Lê Quyền<sup>1</sup>, Phạm Thu Hằng<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Trong cây chuyển gen, số lượng bản sao của gen chuyển ảnh hưởng lớn tới mức độ biểu hiện và sự ổn định di truyền của gen chuyển. Vì vậy, xác định số lượng bản sao của gen chuyển là cần thiết. Số lượng bản sao của gen chuyển thường được ước lượng bằng phân tích Southern blot. Tuy nhiên, phương pháp này thường tốn nhiều thời gian, đòi hỏi số lượng mẫu thực vật lớn và có thể phải sử dụng các đồng vị phóng xạ nguy hiểm. Vì vậy, trong thí nghiệm này đã sử dụng kỹ thuật PCR định lượng thời gian thực (qRT-PCR) để định lượng số bản copy và xác định thể đồng hợp tử của gen chuyển. Kết quả, từ 51 dòng lúa chuyển gen *OsNAC1* thế hệ T0 đã xác định được 28 dòng mang một bản copy và 23 dòng mang hơn một bản copy của gen chuyển. Phân tích di truyền cho phép xác định được 13 dòng lúa thế hệ T1 mang gen ngoại sinh *OsNAC1* ở thể đồng hợp tử. Các dòng lúa chuyển gen ở thể đồng hợp tử này sẵn sàng cho việc phân tích khả năng kháng hạn.

**Từ khóa:** Lúa chuyển gen, số lượng bản copy gen chuyển, kỹ thuật PCR định lượng thời gian thực

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quá trình chuyển gen, đoạn ADN mới được chèn ngẫu nhiên vào hệ gen của cây chủ, với một hay nhiều bản sao trên một hoặc các vị trí khác nhau của cùng một NST hoặc trên nhiều NST. Số lượng nhiều bản sao của gen ngoại sinh chèn vào hệ gen vật chủ là nguyên nhân gây bất hoạt gen chuyển hoặc làm biểu hiện gen chuyển không ổn định, thậm chí ảnh hưởng đến biểu hiện của các gen khác trong hệ gen.

Thông thường, một cây chủ nhận 1 bản copy gen chuyển thường có mức biểu hiện của gen chuyển cao, ổn định. Chính vì vậy, bước thiết yếu đầu tiên khi thu nhận được cây chuyển gen là xác định số lượng bản copy gen chuyển (Iyer và *ctv.*, 2000; Kooter và *ctv.*, 1999; Vaucheret và *ctv.*, 1998). Southern blot là phương pháp đầu tiên và thường được sử dụng để xác định số lượng bản copy ADN trong cây chuyển gen (Bhat SR và Srinivasan S, 2002). Phương pháp này có độ tin cậy cao nhưng có một số hạn chế như thí nghiệm rườm rà, cần số lượng mẫu ADN lớn và có thể gây hại sức khỏe do phải sử dụng phóng xạ trong quá trình thí nghiệm. Đặc biệt, phương pháp Southern blot có thể thất bại trong việc đánh giá chính xác số lượng bản sao do sự thay đổi ADN, mất vị trí nhận biết của enzyme hạn chế hoặc các bản sao nằm gần nhau. Ngoài ra, Southern blot không xác định được thể đồng hợp trong thế hệ T1 mà chỉ được xác định ở thế hệ T2 bằng cách phân tích tỉ lệ phân ly. Hơn nữa, Southern blot đòi hỏi mỗi cấu trúc phải có một đầu dò cụ thể và được gắn mác (phóng xạ, huỳnh quang...) phù hợp với từng cấu trúc (Bubner B và Baldwin IT, 2004).

Gần đây, phương pháp Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) được áp dụng thành công trong việc xác định số bản copy gen chuyển và cây mang kiểu gen đồng hợp tử, thậm chí ngay ở thế hệ T1. Ưu điểm của phương pháp qRT-PCR là không cần đường chuẩn; nồng độ ADN có thể thay đổi chút ít giữa các mẫu, nhưng điều quan trọng là các phản ứng có hiệu quả khuếch đại gần giống nhau và phát hiện gen chuyển nạp bất kể vị trí của gen trong hệ gen. Cho đến nay, phương pháp qRT-PCR đã được sử dụng phổ biến để xác định số lượng bản copy và thể đồng hợp trong cây chuyển gen như lúa mì (Gadaleta A, 2001; Li ZW, 2004), ngô (Shou HX, 2004; Zhang và *ctv.*, 2013), lúa (Yang LT, 2005), cà chua (German MA, 2003) và mía (Casu RE, 2012)...

*OsNAC1* là một gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ NAC có liên quan đến tính chống chịu với bất lợi môi trường ở lúa được phân lập từ lúa và đã được nghiên cứu chi tiết đặc tính. Cây lúa chuyển gen *OsNAC1* tăng cường tính chịu hạn, mặn và kết quả phân tích microarray cho thấy biểu hiện của gen ngoại sinh *OsNAC1* đã hoạt hóa hàng loạt gen chức năng liên quan đến tính chịu hạn. Kết quả thử nghiệm trên đồng ruộng các cây lúa chuyển gen *OsNAC1* cho năng suất cao hơn 22-34% so với các cây đối chứng ở điều kiện hạn (Liu G và *ctv.*, 2014, You J và *ctv.* 2013, Hu H và *ctv.*, 2006).

Thí nghiệm này đã tiến hành sàng lọc cây lúa chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* mang một bản copy đời T0 và xác định thể đồng hợp tử ở đời T1. Các dòng này được sử dụng là nguyên liệu trong đánh giá tiềm năng tăng cường tính chịu hạn của gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* trong cây lúa chuyển gen.

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các dòng lúa chuyển gen *OsNAC1* biểu hiện dưới sự điều khiển promoter Ubiquitin, Lip9 đời T0 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 tổng hợp bởi Sigma (Mỹ).

Bộ hóa chất MESA Blue của hãng Eurogentec được dùng cho phản ứng PCR định lượng. Các hóa chất cơ bản, các chất kích thích sinh trưởng, kháng sinh sử dụng trong nuôi cấy mô được mua các công ty Sigma (Mỹ) và Merk (Đức).

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

Tên oligo	Trình tự	Gen/vector
OsNAC1-t-Fw	5'-GAACAACAGCAGCCTGTTCG-3'OH	<i>OsNAC1</i>
Hyg-Fw	5'-AAACTGTGATGGACGACACCGT-3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-Rv	5'-GTGGCGATCCTGCAAGCTCC-3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-RT-Fw	5'-CGAAGAATCTCGTGCTTTCA-3'OH	<i>HPT</i>
Hyg-RT-Rv	5'-ATGCAAAGTGCCGATAAACA-3'OH	<i>HPT</i>
NosT-Rv	5'-AGACCGCAACAGGATTCAA-3'OH	pBIG

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết DNA tổng số từ lá lúa

DNA tổng số của cây lúa chuyển gen được tách chiết theo phương pháp của Doyle và *ctv.*, 1990 (Doyle JJ and Doyle JL, 1990), sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nito lỏng, sau đó được bổ sung 500  $\mu$ l dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500  $\mu$ l hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn hợp sau được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA tinh sạch. Kết quả tách chiết DNA tổng số được kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

#### 2.2.2. Đánh giá số lượng bản sao của gen chuyển

Phản ứng PCR định lượng theo thời gian thực sử dụng bộ kit MESA Blue của hãng Eurogentec. DNA tổng số (10 ng/ $\mu$ l) của cây lúa chuyển gen được sử dụng trực tiếp làm khuôn cho qRT-PCR. Phản ứng qRT-PCR được tiến hành với môi đặc hiệu cho gen Hygromycin Hyg-RT-Fw/ Hyg-RT-Rv (bảng 1) và 1 gen đối chứng (chưa công bố-đang xin bản quyền). Thành phần của phản ứng bao gồm: 7,5  $\mu$ l MESA Blue (bao gồm Hotstart Meteor Taq, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR, chất nội chuẩn ROX và chất chỉ thị màu xanh dương), 0,4  $\mu$ l mỗi loại mồi (10 pmol/ $\mu$ l); 1  $\mu$ l khuôn (DNA) và 5,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy Mx3005P (Stratagene, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng qRT-PCR như sau: 10 phút - 95°C; (95°C - 15 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 30 giây) x 40 chu kỳ; 72°C - 10 phút; mẫu bảo quản ở 4°C. Số

lượng bản 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 Hygromycin và gen đối chứng theo công thức quy đổi NC = 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> (trong đó  $\Delta$ Ct = C<sub>t Hygromycin</sub> - C<sub>t đối chứng</sub>). Theo đó ở thể hệ T<sub>0</sub> do cây chuyển gen đều là thể dị hợp tử nên nếu Ct của Hygromycin (dị hợp tử) xấp xỉ hoặc lớn hơn C<sub>t đối chứng</sub> (đồng hợp) thì cây chuyển gen sẽ mang nhiều hơn 1 bản sao trong tế bào. Ở thể hệ T<sub>0</sub> việc 1 cây chuyển gen được cho là chỉ mang 1 bản copy khi tỷ số quy đổi 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> giao động trong khoảng từ 0,4 đến 0,7; hơn một bản copy khi tỷ số quy đổi 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> giao động trong khoảng từ 0,9 đến lớn hơn 1,2 (Zhang và *ctv.*, 2003). Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần trong 1 thí nghiệm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

#### 2.2.3. Sàng lọc cá thể đồng hợp tử

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

Phản ứng PCR định lượng theo thời gian thực sử dụng bộ kit MESA Blue của hãng Eurogentec. Tương tự như xác định số lượng copy ở thể hệ T<sub>0</sub>, tỷ số quy đổi 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> ở cây chuyển gen thể hệ T<sub>1</sub> cho phép xác định mức độ đồng hợp tử và dị hợp tử của các cây chuyển gen mang 1 bản copy. Theo đó tỷ số quy đổi 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> giao động trong khoảng 0,4 đến 0,7 thì cây sẽ được đánh giá là dị hợp tử còn nếu tỷ số quy đổi 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> xấp xỉ 1 cây sẽ được đánh giá là đồng hợp tử (Zhang và *ctv.*, 2003).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả xác định số lượng bản copy các cây chuyển gen ở thế hệ T<sub>0</sub>

Đã tiến hành xác định số lượng bản sao của cấu trúc chuyển gen trong 51 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/μl. Phản ứng định lượng được tiến hành với mỗi được thiết kế trên gen Hygromycin (Hyg-RT-Fw và Hyg-RT-Rv, Bảng 1) 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

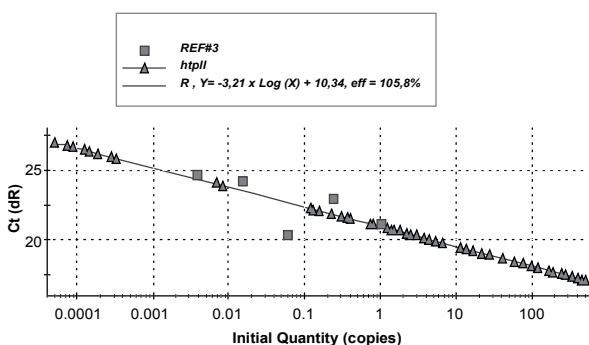
so sánh gián tiếp thông qua so sánh hàm lượng gen đối chứng (gen đã được chứng minh chỉ tồn tại đơn bản trong hệ gen lúa).

Về nguyên tắc, cả hai cặp mỗi thiết kế cho Hygromycin và gen đối chứng đều cho hiệu suất nhân bản tương đương nhau và gần bằng 1 (1,002 và 1,003) (hình 1), ngoài ra, mức độ liên hệ tuyến tính phải chặt chẽ. Kết quả thí nghiệm cho thấy, phản ứng định lượng PCR với gen *OsNAC1* (thông qua định lượng gen *hpt*) đáp ứng được các nguyên tắc trên và có hệ số quy đổi  $2^{\Delta Ct}$  từ 0,4 - 1,12, trong đó 28 dòng lúa có  $2^{\Delta Ct}$  từ 0,4 - 0,67 tương ứng với 1 bản copy và 23 dòng có  $2^{\Delta Ct}$  từ 0,92 - 1,12 tương ứng với hơn 1 bản copy (Bảng 2).

**Bảng 2.** Kết quả kiểm tra cây T<sub>0</sub> mang gen chuyển có một bản copy

Cấu trúc gen chuyển	Số cây kiểm tra	PCR			qRT-PCR (1 bản copy)
		Actin	Hygromycin	Mỗi (gen+nos)	
<i>Lip9: OsNAC1</i>	29	29/29	21/29	21/29	12/21
Ubi: OsNAC1	36	36/36	30/36	30/36	16/30
Tổng	65	65/65	51/65	51/65	28/51

Như vậy, sử dụng phương pháp qRT-PCR cho phép xác định được số lượng bản copy trong cây lúa chuyển gen. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã sử dụng phương pháp này để xác định số lượng bản copy trong các cây trồng chuyển gen ở lúa, ngô, cà chua, mía và đậu tương (Li ZW, 2004; Zhang và *ctv.*, 2015; German MA, 2003; Casu RE, 2012; Chu Y và *ctv.*, 2013).



**Hình 1.** Đánh giá hiệu suất RT-PCR cho hai cặp môi Hyg-Fw/Rv và REF#3

#### 3.2. Kết quả sàng lọc và xác định các dòng lúa chuyển gen đồng hợp tử ở thế hệ T<sub>1</sub>

28 cây lúa mang 1 bản copy gen chuyển được trồng trong nhà lưới, chỉ 13/28 cây thu được hạt (gồm 5 cây chuyển gen *Lip9:OsNAC1*, 8 cây chuyển gen *Ubi:OsNAC1*). Các hạt thu được từ cây T<sub>0</sub> hay

còn gọi là hạt T<sub>1</sub> sẽ được đánh giá khả năng nảy mầm trên môi trường bổ sung Hygromycin để loại bỏ các cây T<sub>1</sub> không mang cấu trúc chuyển gen do phân ly độc lập và tổ hợp tự do của các nhiễm sắc thể. Sự xuất hiện hạt T<sub>1</sub> không có khả năng nảy mầm trên môi trường chứa Hygromycin 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 T<sub>0</sub> được cho tự thụ phấn hoàn toàn), (ii) vị trí và số lượng bản sao của cấu trúc biểu hiện gen trong hệ gen cây chủ ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện của gen chuyển. Các cây lúa non kháng hygromycin sau đó được kiểm tra kiểu gen đồng hợp tử bằng qRT-PCR. Kết quả sàng lọc dòng lúa chuyển gen T<sub>1</sub> thể hiện bảng 3.

Kết quả xác định tính trạng của 95 cây lúa chuyển gen ở bảng 3 cho thấy có 45 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 13 cây T<sub>1</sub> 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). Kết quả đánh giá kiểu gen đồng hợp tử sẽ được chúng tôi đánh giá tiếp tục ở thế hệ tiếp theo bằng cả hai chỉ tiêu: tỷ lệ nảy mầm trên Hygromycin và PCR đặc hiệu.

**Bảng 3.** Kết quả sàng lọc các dòng lúa chuyển gen T<sub>1</sub>

Các dòng lúa chuyển gen T <sub>1</sub>		Số hạt kiểm tra	Số hạt nảy mầm trên Hygromycin	PCR (+)			Số cây đồng hợp (> 1 bản copy)
				Môi actin	Môi Hygro	Môi (gen+nos)	
<i>Lip9: OsNAC1</i>	L1	5	3	3/3	3/3	3/3	1/3
	L2	12	9	9/9	9/9	9/9	2/9
	L3	6	2	2/2	2/2	2/2	0/2
	L4	18	12	12/12	11/12	11/12	2/11
	L5	7	4	4/4	3/4	3/4	1/3
<i>Ubi: OsNAC1</i>	U1	2	0	0/0	0/0	0/0	0/0
	U2	7	5	5/5	5/5	5/5	1/5
	U3	4	3	3/3	3/3	3/3	0/3
	U4	15	12	12/12	11/12	11/12	3/11
	U5	5	4	4/4	4/4	4/4	1/4
	U6	10	7	7/7	7/7	7/7	2/7
	U7	2	1	1/1	0/1	0/1	0/1
	U8	2	0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Tổng cộng</i>		95	62/95	62/62	58/62	58/62	13/58

Các cây coi là đồng hợp tử (13 cây T<sub>1</sub>) tiếp tục được trồng trong điều kiện nhà lưới để thu hạt. Khi sinh trưởng phát triển trong nhà lưới thì chỉ có 11 cây sinh trưởng bình thường so với cây đối chứng còn 2 cây không kết hạt là cây chuyển cấu trúc *Ubi:OsNAC1*. Các hạt cây T<sub>1</sub> hay còn gọi hạt T<sub>2</sub> được thu nhận và tiến hành kiểm tra sự nảy mầm ngẫu nhiên của 30 hạt cho mỗi dòng trên môi trường Hygromycin. Kết quả cho thấy tỷ lệ nảy mầm cho mỗi dòng chuyển gen đều đạt ~ 100%. Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen đích trong các cây lúa chuyển gen T<sub>2</sub> này được phát hiện bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc gen *OsNAC1*. Kết quả thu được cho thấy 100% các mẫu ADN tách chiết đều cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi Actin-Fw/Actin-Rv, chứng tỏ chất lượng ADN tách chiết hoàn toàn đạt yêu cầu cho thí nghiệm. Các phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của cấu trúc *OsNAC1-t-Fw/NOS-Rv* cho kết quả tương tự. Kết quả này chứng tỏ đã thu được các cây lúa chuyển gen T<sub>2</sub> có mang kiểu gen đồng hợp tử với 1 bản copy cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1* trong hệ gen.

Như vậy qua sàng lọc, đánh giá với các thí nghiệm qRT-PCR, đánh giá tỷ lệ nảy mầm trên môi trường bổ sung Hygromycin và PCR thông thường chúng tôi đã thu được tổng số 13 dòng chuyển gen đồng hợp ở thể hệ T<sub>1</sub> cho cả 2 công thức thí nghiệm (6 dòng *Lip9:OsNAC1* và 7 dòng *Ubi: OsNAC1*). Tiếp

đó, 13 dòng lúa non đồng hợp tử mang một bản sao cấu trúc chuyển gen đã được chúng tôi chuyển sang trồng trong điều kiện môi trường bình thường, 11/13 dòng thu được hạt được tiếp tục phân tích đặc điểm kiểu hình.

#### IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp qRT-PCR, đánh giá tỷ lệ nảy mầm trên môi trường bổ sung Hygromycin và PCR thông thường, xác định được 28 cây lúa mang một bản copy, 23 cây lúa chuyển gen mang hơn một bản copy đời T<sub>0</sub>. Phân tích di truyền cho phép xác định được 13 dòng lúa đồng hợp tử đời T<sub>1</sub>, trong đó 11 dòng lúa thu được hạt T<sub>2</sub>. Các dòng lúa chuyển gen ở thể đồng hợp tử này sẵn sàng cho việc phân tích khả năng kháng hạn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bubner B, Baldwin IT**, 2004. "Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants". *Plant Cell Rep.* 23 (5): 263-271.
- Bhat SR, Srinivasan S**, 2002. "Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Consideration and approaches". *Plant Sci.* 163(4): 673 – 681.
- Casu RE, Selivanova A, Perroux JM**, 2012. "High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR". *Plant Cell Rep.* 31 (1): 167-177.

- Chu Y, Bhattacharya A, Wu C, Knoll J, Ozias-Akins P**, 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.
- Gadaleta A, Giancaspro A, Cardone MF, Blanco A**, 2011. "Real-time PCR for the detection of precise transgene copy number in durum wheat". *Cell Mol Biol Lett*. 16 (4): 652-668.
- German MA, Kandel-Kfir M, Swarzburg D, Matsevitze T, Granot D**, 2003. "A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants". *Plant Sci*. 164 (2): 183-187.
- Iyer LM, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC**, 2000. "Transgene silencing in monocots". *Plant Mol Biol*. 43: 323-346.
- Kooter JM, Matzke TA, and Meyer P**, 1999. "Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation, and pathogen control". *Trends Plant Sci*. 4: 340-347.
- Li ZW, Hansen JL, Liu Y, Zemetra RS, Berger PH**, 2004. "Using real-time PCR to determine transgene copy number in wheat". *Plant Mol Biol Rep*. 22 (2): 179-188.
- Shou HX, Frame BR, Whitham SA, Wang K**, 2004. "Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation". *Mol Breeding*. 13 (2): 201-208.
- Vaucheret H, Beclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S**, 1998. "Transgene-induced gene silencing in plant". *Plant J*. 16: 651-659.
- Yang L, Ding J, Zhang C, Jia J, Weng H, Liu W, Zhang D**, 2005. "Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR". *Plant Cell Rep*. 23: 759-763.
- Zhang YW, Liu YJ, Ren Y, Liu Y, Liang GM, Song FP, Bai SX, Wang JH, Wang GY**, 2013. "Overexpression of a novel Cry1Ie gene confers resistance to Cry1Ac-resistant cotton bollworm transgenic lines of maize". *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 115: 151-158.
- Zhang Y, Zang D, Li W, Cheng J, Peng Y, Cao W**, 2003. "A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe". *Nucleic Acids Res*. 31: e123.
- Liu G, Li X, Jin S, Liu X, Zhu L, Nie Y and Zhang X**, 2014. "Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton". *PLoS One*, 9(1).
- You J, Zong W, Li X, Ning J, Hu H, Li X, Xiao J and Xiong L**, 2013. "The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice". *J. Exp. Bot.*, 64(2):569-83.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q and Xiong L**, 2006. "Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(35):12987-92.
- Doyle JJ and Doyle JL**, 1990. "Isolation of plant DNA from fresh tissue". *Focus*, 12:13-15.

## Estimating the number of transgene copies and homozygous in *OsNAC1* transgenic rice by Quantitative Real-Time PCR assay

Cao Le Quyen, Pham Thu Hang, Pham Xuan Hoi

### Abstract

In transgenic plants, the number of transgene copies can greatly influence the level of expression and genetic stability of the target gene. The number of transgene copies are estimated by Southern blot analysis, which is laborious and time-consuming, requires relatively large amounts of plant materials, and may involve hazardous radioisotopes. The real-time PCR technique was used for estimating the number of transgene copies and homozygous in transgenic rice. As a result, 51 transgenic rice lines were obtained, including 28 lines carrying a copy, 23 lines carrying more than one copy of the integrated gene. In similar way, 13 T1 transgenic lines were identified as homozygous. These homozygous transgenic plants are ready for drought tolerance analysis.

**Key words:** Transgenic rice, number of transgene copies, quantitative Real-Time PCR

Ngày nhận bài: 12/4/2017

Người phản biện: PGS. TS. Chu Hoàng Hà

Ngày phản biện: 16/5/2017

Ngày duyệt đăng: 29/5/2017

## SỬ DỤNG ĐỒNG VỊ BỀN $^{15}\text{N}$ XÁC ĐỊNH HIỆU LỰC PHÂN BÓN ĐẠM CHO CẢI BẮP (*Brassica oleracea*) TRÊN ĐẤT XÁM VÀ PHÙ SA

Đỗ Trọng Thăng<sup>1</sup>, Trần Minh Tiến<sup>1</sup>, Phùng Thị Mỹ Hạnh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Thí nghiệm đồng ruộng sử dụng kỹ thuật đánh dấu đồng vị  $^{15}\text{N}$  để đánh giá hiệu lực sử dụng đạm (N) cho cây cải bắp được tiến hành trên đất xám (*Acrisols* ở Đông Anh) và đất phù sa (*Fluvisols* ở Hoài Đức) thuộc Hà Nội. Kết quả thí nghiệm cho thấy năng suất của cải bắp đạt cao nhất ở mức bón 180 kg N/ha và hiệu lực phân bón N đạt mức cao nhất khi sử dụng 140 kg N/ha trên đất xám và đất phù sa. Khi tăng mức phân đạm từ mức 0 kg N/ha lên mức 180 kg N/ha thì tỷ lệ hấp thu đạm của cải bắp cũng tăng theo, nhưng có sự khác biệt rõ giữa hai loại đất (từ 24 - 29% đối với đất phù sa và 42 - 52% đối với đất xám). Khi bón đạm vượt quá 220 kg N/ha thì cải bắp hấp thu hàm lượng N không có sự khác biệt nhiều trên cả đất xám và đất phù sa trong khi đó hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  tích lũy trong cải bắp tăng lên vượt mức quy định về an toàn vệ sinh thực phẩm. Việc giảm lượng phân đạm, kết hợp giãn thời gian giữa lần bón cuối và thời điểm thu hoạch là cần thiết để có hiệu quả kinh tế đồng thời đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm đối với sản phẩm rau cải bắp.

**Từ khóa:** Đồng vị,  $^{15}\text{N}$ , đất xám, đất phù sa, hiệu lực phân đạm, hàm lượng  $\text{NO}_3^-$ , vệ sinh ATTP

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rau xanh là nguồn thực phẩm thiết yếu trong đời sống của con người, là nguồn cung cấp các vitamin và khoáng chất rất cần thiết cho sức khỏe con người. Theo FAO (2012), Việt Nam là nước có diện tích rau lớn thứ 4 ở Châu Á (sau Trung Quốc, Ấn Độ và Philippin), tuy nhiên bình quân năng suất rau ở nước ta còn thấp hơn năng suất rau trung bình của châu Á khoảng 16%. Trong các loại rau xanh ăn lá ở Việt Nam thì rau họ thập tự (*Cruciferae*), chiếm vị trí quan trọng hàng đầu, với diện tích khoảng 44.800 ha, trong đó cải bắp có diện tích lớn nhất. Các vùng trồng rau cải bắp ở Việt Nam tập trung chủ yếu i) ở miền Nam: tỉnh Lâm Đồng, trên nhóm đất đỏ và đất xám (*Ferralsols* và *Acrisols*), ii) ở miền Bắc: tại các tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng, trên nhóm đất phù sa và đất xám (*Fluvisols* và *Acrisols*) (Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, 2016).

Theo Bùi Quang Xuân (1998), cải bắp đòi hỏi nhiều phân, đặc biệt là đạm (N), nếu thiếu N bắp sẽ không cuốn, nhưng nếu quá nhiều N, cải bắp không những cuốn không chặt, dễ bị thối bên trong, mà còn gây tích lũy nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), ảnh hưởng sức khỏe người tiêu dùng. Do vậy, nâng cao hiệu quả sử dụng phân N trong canh tác rau ăn lá phải được quan tâm, không những giảm chi phí sản xuất, giảm tác động xấu đến môi trường do việc bón quá nhiều phân vô cơ vào trong đất, mà còn đảm bảo vệ sinh, an toàn thực phẩm.

Đồng vị  $^{15}\text{N}$  đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu đánh giá khả năng hấp thu, trao đổi N trong đất, cũng như xác định hiệu lực hấp thu phân N của cây trồng, đây được coi là kỹ thuật có

độ tin cậy cao (Jensen *et al.*, 2000; Tran Minh Tien *et al.*, 2013). Do đó trong nghiên cứu này ứng dụng kỹ thuật đánh dấu này để có những đánh giá chính xác về hiệu lực phân bón đạm của cải bắp đối với các mức phân bón khác nhau, qua đó xây dựng mức phân bón hợp lý cho người dân đối với các vùng trồng cải bắp chính trên hai loại đất *Fluvisols* và *Acrisols* tại Hà Nội.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Phân urea thương phẩm với tỷ lệ N là 46% và phân bón urea chứa đồng vị bền  $^{15}\text{N}$  5% do Cơ quan Năng lượng nguyên tử Quốc tế (IAEA) cung cấp. Phân urea chứa  $^{15}\text{N}$  được pha loãng với tỷ lệ 2% để tiến hành thực hiện thí nghiệm.

Cải bắp sử dụng giống KK Cross, là giống được trồng phổ biến tại địa phương.

#### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành trên đất xám bạc màu (*Acrisols*) tại xã Nam Hồng, huyện Đông Anh và trên đất phù sa sông Hồng (*Fluvisols*) tại xã Song Phương, huyện Hoài Đức, thành phố Hà Nội.

#### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.3.1. Phương pháp thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 5 công thức 3 lần lặp lại. Mỗi ô thí nghiệm được thiết kế với chiều dài 4,5 m và chiều rộng 2,8 m. Mỗi loại đất, công thức bón đạm, và ô sử dụng đồng vị bền  $^{15}\text{N}$  được chia ra lần lượt thành ô chính, ô phụ và ô sử dụng để đánh giá tỷ lệ% đồng vị bền do cây trồng hấp thu.

<sup>1</sup> Viện Thổ nhưỡng Nông hóa