

Mẫu ADN plasmid được tiến hành cắt với enzyme giới hạn để kiểm tra đoạn promoter gắn. Kết quả điện di sản phẩm ADN plasmid (hình 5.B).

#### **IV. KẾT LUẬN**

Đã là tách chiết được promoter *OsNAC6* từ các dòng lúa Việt Nam, đưa được vector nhân dòng pSK-*OsNAC6* chuyển vào *E.coli* và đã đưa thành công vào vector biểu hiện pBIH-*OsNAC6* mang gen *gus* và gen *hpt* vào các chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 và AGL1, sử dụng làm trung gian biến nạp để đưa promoter *OsNAC6* vào các cây trồng có tiềm năng. Kết quả này là tiền đề để tiếp tục hướng đến việc tạo ra các cây trồng chuyển gen như lúa, ngô, đậu tương có khả năng chống chịu điều kiện bất lợi tốt nhờ sự có mặt của các promoter cảm ứng.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K (1999). *Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-*

*inducible transcription factor*. Nature Biotechnology 17: 287-291.

2. Kasuga M., Miura S., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K (2004). *A combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible rd29A Promoter Improved Drought-and Low-Temperature Stress Tolerance in Tobacco by gen Transfer*. Plant Cell Physiol 45(3): 346-350.

3. Nakashima K., Lam-Son P., Dong V.N., Fujita M., Maryyama K., Todaka D., Ito Y., Hayashi N., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K (2007). *Functional analysis of a NaC-type transcription factor OsNAC6 involed in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice*. The plant Journal: 617-630.

4. Dey M.M., and Upadhyaya H.K (1996). *Yield loss due to drought, cold and submergence in Asia*. In R.E. Evenson, R.W. Herdt and M. Hossain eds., Rice Research in Asia: Progress and Priorities. CAB: 291-304.

**Người phản biện:**  
**GS. TSKH. Trần Duy Quý**

## **HOẠT ĐỘNG CỦA PROMOTER *OsNAC6* TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU TRÊN DÒNG LÚA VIỆT NAM CHUYỂN GEN CH1**

Nguyễn Văn Đồng

### **SUMMARY**

#### ***OsNAC6* promoter activity of enhancing resistance to the Vietnam transgenic rice lines CH1**

The drought, salt and cold are unfavourable factors of the environment in reduced productivity of rice. *OsNAC6* promoter activity of rice helps increase resistance to adverse conditions. *OsNAC6* promoter was transformed into rice calli from mature embryos of line CH1 through *Agrobacterium tumefaciens*. After two consecutive selection on culture medium added 50 mg/l hygromycin were screened for 13 plants survived. Conducted artificial stress to the T1 generation seedlings through gene expression of *Gus*. *Gus* staining results of the T1 stress rice plants showed promoter *OsNAC6* works well on rice, transformation experiments, regenerated rice made with this vector was successful.

**Keyword:** *Agrobacterium tumefaciens*, *OsNAC6*, rice.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa nước, lúa mì và ngô là ba nguồn lương thực quan trọng nhất, được dùng làm thức ăn cho người và động vật (FAO, 1997). Ở Việt Nam, lúa nước là nguồn lương thực quan trọng nhất. Để cải thiện chất lượng lúa, trải qua nhiều năm, các phương pháp truyền thống như lai giống, chọn lọc đã được áp dụng. Công nghệ gen cho phép các nhà di truyền và chọn giống tạo ra những cây trồng biến đổi gen mang những đặc tính mới đáp ứng yêu cầu của con người. Promoter của gen mã hóa *OsNAC6* ở cây lúa là một promoter cảm ứng đặc hiệu, được sử dụng để điều khiển biểu hiện gen *OsNAC6* trong cây lúa tham gia vào quá trình chống chịu lại các điều kiện bất lợi như mặn, lạnh và hạn hán. Theo nghiên cứu của Nakashima & cs năm 2007 cho thấy, việc chuyển thêm đoạn gen *OsNAC6* làm tăng cường khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh như mặn, hạn, lạnh. Từ các kết quả nghiên cứu trên thế giới, chúng tôi tiến hành biến nạp đoạn promoter *OsNAC6* vào lúa để kiểm tra mức độ hoạt động của promoter này ở thể hệ cây To và T1 chuyển gen.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm sử dụng dòng lúa CH1 của Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mang vector chứa đoạn promoter - *OsNAC6* và hpt - kháng hygromycin được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

**Quy trình:** Hạt lúa sau khi tách vỏ hạt được cho khử trùng với ethanol 70% trong 90s và NaClO 5% trong 30 phút, lắc 100vòng/phút bằng máy lắc. Hạt sau khi khử trùng được tiến hành nuôi cấy trên môi trường tạo callus CIM từ 6-7 ngày ở 28°C. Các callus có màu sáng được chọn tiếp tục cấy chuyển qua các môi trường CIM (3 - 4 ngày) để phục vụ cho chuyển gen. Các callus được lây nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium*, đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối ở 25°C. Sau đó, các callus được rửa trong dung dịch diệt khuẩn chứa 3% sucrose và carbenecilin 500mg/l. Callus được chuyển vào môi trường chọn lọc (gồm CIM + carbenecilin 200mg/l + hygromycin 50mg/l). Sau hai tuần nuôi, các callus chuyển gen được đưa sang môi trường tái sinh từ 7 - 8 ngày. Các cây con được chuyển ra đất và trồng trong nhà kính hoặc trong nhà lưới. Cây con To được tiến hành phân tích PCR với gen *Gus*, *Hpt* và đoạn promoter *OsNAC6* có các trình tự mỗi lần lượt là:

<i>Gus</i> -F-5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAAC-3'	<i>Gus</i> -R-5'-TCATTGTTTGCCTCCCTGCT-3'
<i>Hpt</i> -F-5'-AGAAGAAGATGTTGGCGACCT-3'	<i>Hpt</i> -R-5'-GTCCTGCGGGTAAATAGCTG-3'
<i>OsNAC6</i> -Pro-F1-5'- AAGCTTTCGCCGGAGAACGGACGATC-3'	<i>OsNAC6</i> -Pro-R1-5'- GGATCCTATCACTACACCTAAGCTTC-3'

Chu trình PCR nhân đoạn promoter *OsNAC6* được tiến hành với chu kỳ như

sau: Ban đầu 94°C (2 phút), tiếp đó là 30 chu kỳ trong đó có 94°C (15giây), 58°C

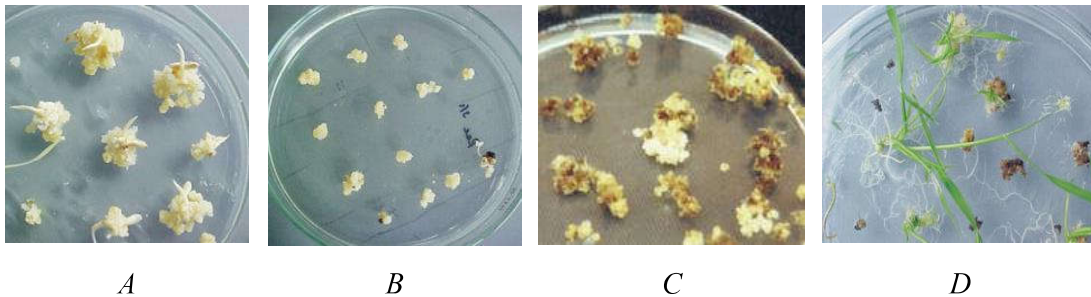
(15giây), 72°C (90giây); cuối cùng là 72°C (10 phút). Các cây cho kết quả dương tính được tiến hành trồng thu hạt, kiểm tra mức độ hoạt động của promoter thông qua biểu hiện gen *Gus* ở thể hệ T1. Các thí nghiệm stress nhân tạo được thiết kế bao gồm: Thí nghiệm về mặn (NaCl 250mM), hạn (sử dụng để khô tự nhiên trong 12h rồi nuôi phục hồi 24h), lạnh (để trong nhiệt độ 4°C trong 12h, sau đó phục hồi 24h). Sản phẩm của gen *Gus* được nhận biết sau khi nhuộm với x-Gluc trong 24h.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Kết quả chuyển đoạn promoter *OsNAC6* vào dòng lúa CH1

Trong nghiên cứu chuyển gen vào lúa thông qua trung gian *Agrobacterium* thì vật liệu sử dụng biến nạp được coi là yếu tố quan trọng nhất để tăng hiệu quả biến nạp. Trước đây, Hiei và cs (1994); Rashid và cs (1996) đã sử dụng mô sẹo 3 tuần tuổi để lây nhiễm, còn (Kumar K.K et al., 2005) sử

dụng mô sẹo 2 tháng tuổi phát sinh từ phôi callus. Chúng tôi sử dụng mô sẹo 2 tháng tuổi phát sinh từ phôi callus. Đồng thời đã cải tiến môi trường phát sinh mô sẹo bằng việc tăng lượng agar, sử dụng maltose như một nguồn cacbon, và tăng nồng độ 2,4D (3mg/l) (hình 1A). Mô sẹo 2 tháng tuổi sẽ chịu được trong môi trường lây nhiễm cũng như đồng nuôi cấy để tăng hiệu quả biến nạp. Trong nghiên cứu hiện này, chúng tôi đã sử dụng xâm nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium* với nồng độ thấp OD<sub>600</sub> = 0,5 đã giảm được tỷ lệ mô sẹo chết sau lây nhiễm và đồng nuôi cấy trong tối. Trong lần chọn lọc đầu tiên, các mô sẹo sẽ được giữ trong môi trường tối thiểu nhất là 25 ngày để phân biệt giữa các tế bào đã được biến nạp và không biến nạp (Hình 1.B). Các mô sẹo phát triển tốt trong lần chọn lọc thứ 2 được chuyển sang môi trường tái sinh chồi trong 2 tuần. Đối với dòng lúa CH1 sử dụng nồng độ hygromycin giảm (30 mg/l) đã cho thấy khả năng tái sinh tốt hơn (Hình 1.C và 1D).



Hình 1. Kết quả biến nạp qua *Agrobacterium tumefaciens* có đoạn promoter *OsNAC6* vào giống lúa CH1: (A) Hạt 1 tháng tuổi trưởng thành tạo mô sẹo, (B) Mô sẹo chọn lọc lần 1 trên môi trường có hygromycin (50 mg/l), (C) Mô sẹo chọn lọc lần hai trên môi trường có hygromycin (50 mg/l), (D) Phát sinh chồi trên môi trường có hygromycin (30 mg/l).

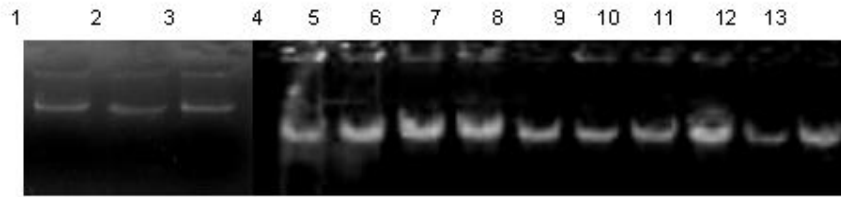
Bảng 1. Hiệu quả biến nạp đoạn promoter *OsNAC6* vào dòng lúa CH1

Giống lúa	Số mẫu đồng nuôi cấy	Số mô sẹo sống sau 2 lần chọn lọc	Số mẫu tái sinh chồi trên mô sẹo	Hiệu quả biến nạp (%)
CH1	150	8	4	2.6
	145	9	6	4.1
	130	6	3	2.3

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu được hiệu suất biến nạp ở dòng lúa CH1 là 2.3 -4.1% (Bảng 1). Các cây tái sinh sau đó được đem trồng ra đất và tiến hành các thí nghiệm phân tích kiểm tra sự biểu hiện của đoạn promoter *OsNAC6* ở 13 cây thể hệ To và T1.

## 2. Kết quả phân tích hoạt động của promoter *OsNAC6* trên dòng lúa CH1 chuyển gen

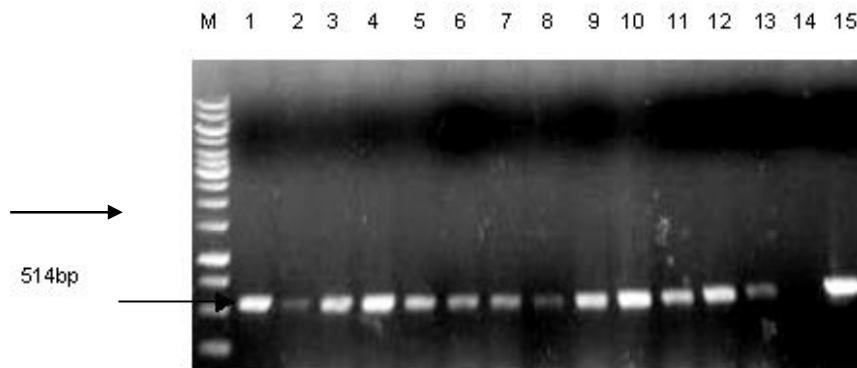
Sau khi biến nạp vector mang đoạn promoter *OsNAC6* vào dòng lúa CH1 thì chúng tôi đã thu được 13 cây thể hệ To. Các cá thể sau chuyển gen ở thể hệ To được tiến hành tách ADN tổng số (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di ADN lúa tổng số cây To

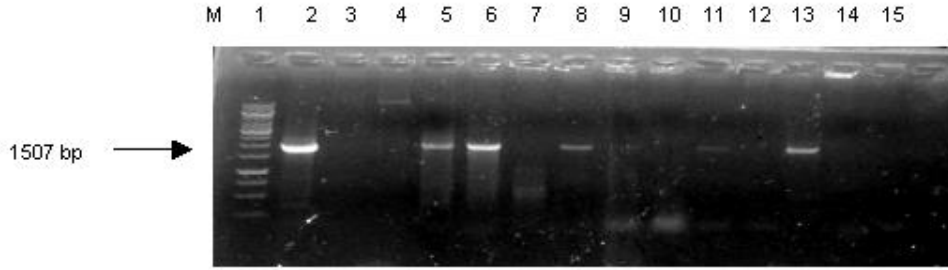
Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm tách có độ tinh sạch khá cao, không bị đứt gãy nhiều, đủ tin cậy để tiến hành cho các thí nghiệm về sau. Các ADN tổng số được sử dụng làm khuôn, tiến hành chạy PCR với cặp mồi *Hpt* (kháng hygromycin) (Hình 3) và *OsNAC6* promoter (Hình 4). Từ kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 2) kiểm tra sự có mặt của gen *Hpt* với cặp mồi *Hpt-F* và

*Hpt-R*, 13 cây thu được sau khi chọn lọc đều cho kết quả dương tính với cặp mồi *Hpt* có kích thước đoạn gen phù hợp với mẫu ADN plasmid (514 bp). Từ kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 3) cho thấy, có 5 trong số 13 cây mang đoạn promoter *OsNAC6* có kích thước 1507 bp (5 cây cho kết quả PCR dương tính với cả *Hpt* và *OsNAC6* promoter).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *Hpt* ở cây lúa To

M: Marker 1kb; 1-13: Mẫu PCR của 13 cây To  
14: H<sub>2</sub>O (mẫu âm tính); 15: Mẫu ADN plasmid (mẫu dương tính)



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR promoter *OsNAC6* ở cây lúa *To*

M: Marker 1kb; 1: Mẫu ADN plasmid (mẫu dương tính)  
2: H<sub>2</sub>O (mẫu âm tính); 3-15: Mẫu PCR của 13 cây *To*



Cont NaCl Dry Cold

Hình 5. Kết quả nhuộm *gus* các cây lúa *T1* sau khi tiến hành stress

Các cá thể *To* cho kết quả PCR dương tính được tiến hành trồng trên môi trường nuôi cấy có bổ sung hygromycin. Các cây này tiếp tục được tiến hành trồng ở thể hệ *T1*. Tại thể hệ *T1*, chúng tôi tiến hành thí nghiệm gây stress nhân tạo để kiểm tra sự hoạt động của promoter *OsNAC6* thông qua biểu hiện sản phẩm của gen *Gus*. 5 dòng *T1* được tiến hành cho nảy mầm trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc hygromycin (50mg/l). Sau 14 ngày, các cây mạ non *T1* được đem xử lý stress với 3 nhóm thí nghiệm (NaCl, Dry, Cold). Các cây được nuôi phục hồi 24h và tiến hành nhuộm *Gus* trong 24h. Kết quả chỉ ra rằng các cây lúa *T1* stress cho thấy, promoter *OsNAC6* hoạt động tốt trên lúa. Kết quả này cũng đã được Nakashima và cs khẳng định

(2007). Như vậy, các thí nghiệm biến nạp, tái sinh lúa thực hiện với vector này đã thực hiện thành công.

#### IV. KẾT LUẬN

Như vậy, sau các thí nghiệm chuyển đoạn promoter *OsNAC6* vào lúa đã thực hiện thành công. Qua các kết quả kiểm tra sự có mặt của gen trên dòng lúa *CH1* và biểu hiện tạm thời của gene *Gus* trên cây lúa chuyển gen *T1*, chúng tôi thấy rằng promoter *OsNAC6* có hoạt động tăng cường ở trên lúa. Các cây chuyển gen đã được tiến hành trải qua quá trình tái sinh để tiếp tục cho các nghiên cứu sâu hơn, đồng thời xây dựng, hoàn thiện quy trình chuyển gen với vector này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. FAO (1997). *White maize: a traditional food grain in developing countries*. Rome.
2. Hiei Y, Ohta S, Komari T, and Kumashiro T (1994). *Efficient transformation of rice (Oryza sativa) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA*. Plant J 6: 271-282.
3. Kumar K.K, Maruthasalam S, Loganathan M, Sudhakar D, and Balasubramanian P. (2005). *An Improved Agrobacterium-Mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars*. Plant Mol Bio Rep 23: 67-73.
4. Nakashima K., Tran L. S. P., Dong V. N., Fujita M., Ito Y. (2007). *Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic stresses-responsive gene expression in rice*. Plant JouARNI, 51, pp. 617-630.
5. Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, and Hinata K (1996). *Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice*. Plant Cell Rep 15: 727-730.

**Người phản biện**  
**GS. TSKH. Trần Duy Quý**

**KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ GIỐNG LÚA CHỊU NGẬP NHẬP NỘI  
ỨNG PHÓ VỚI ĐIỀU KIỆN BIẾN ĐỔI KHÍ HẬU  
CHO VÙNG ĐỒNG BẰNG VIỆT NAM**

Tạ Hồng Lĩnh, Lê Huy Hàm, Lê Quốc Thanh,  
Lê Hùng Lĩnh, Nguyễn Văn Luận, Phạm Thị Mùi

**SUMMARY**

**Evaluation of Some Imported Rice Tolerance of Submergence to Cope with Climate Change in Coastal Areas of Vietnamese Deltas**

One of the sustainable solutions to deal with climate change causing inundation in some coastal areas of Vietnamese Deltas is to improve rice tolerance of submergence. The objective of this paper was to evaluate the tolerance submergence ability of some rice varieties imported from IRRI. The preliminary results showed that IR64-Sub1 is the best variety with tolerance of submergence ability and being used as the material in rice breeding program; TDK-Sub1 (5.9 tons/ha) and BR11-Sub1 (6.8 tons/ha) are also tolerance of submergence varieties with acceptable rice quality and having resistance with some rice diseases, which could appropriate for growing in some areas of the North and Cuu Long Deltas

**Keywords:** Climate Change; Submergence Tolerant, rice varieties.

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Biến đổi khí hậu là một trong những thách thức lớn nhất đối với nhân loại trong thế kỷ 21. Biến đổi khí hậu sẽ tác động tiêu cực nghiêm trọng đến sản xuất, đời sống và môi trường trên phạm vi toàn thế giới. Nhiệt độ tăng, mực nước biển dâng gây ngập lụt, gây nhiễm mặn, ảnh hưởng đến

nông nghiệp, gây rủi ro lớn đối với công nghiệp và các hệ thống kinh tế - xã hội trong tương lai.

Sản lượng gạo Việt Nam có thể giảm một cách đáng kể do mực nước biển dâng cao và sự thay đổi lượng mưa làm thay đổi thủy học ở các vùng đồng bằng. Mực nước biển dâng cao làm giảm lưu lượng dòng