

TẠO MỘT SỐ DÒNG LÚA MANG GIEN *BAR* KHÁNG THUỐC TRỪ CỎ VÀ NGHIÊN CỨU SỰ DI TRUYỀN CỦA GIEN NÀY ĐẾN THỂ HỆ THỨ HAI

NGUYỄN HỮU HỒ

Viện Sinh học nhiệt đới

Gien *bar*, được phân lập từ *Streptomyces hygroscopicus*, mã hóa enzym phốtphinôthrixin axêtyltransferaza (PAT), từ lâu đã được biết là gen có liên quan đến tính kháng bialaphos - một tripeptit biến dưỡng thứ cấp có chứa phốtphinôthrixin (PPT) - một chất tương đồng của glutamat. PPT là tác nhân ức chế sự tổng hợp enzym glutamin synthetaza (GS) ở thực vật [9]. PPT cũng có khả năng ức chế sự tổng hợp enzym GS ở vi khuẩn.

Từ những năm cuối của thập kỷ 80, người ta đã quan tâm rất nhiều đến việc chuyển gen *bar* vào cây trồng và đến nay người ta đã tạo ra được nhiều loại cây trồng kháng thuốc trừ cỏ với sự biểu hiện cao và di truyền bền vững của gen. Cây lúa mang gen *bar* được xem là một trong những thành tựu có ý nghĩa thực tiễn đầu tiên của công nghệ di truyền cây trồng [4]. Các cây trồng mang gen *bar* tạo enzym PAT có khả năng biến đổi PPT (dạng có hoạt tính diệt cỏ) thành dạng axêtyl hóa (dạng bất hoạt).

Trong ngành trồng lúa ở nước ta, việc làm cỏ bằng tay là một vấn đề đòi hỏi nhiều công sức và thời gian. Vì vậy, theo chúng tôi, việc tạo cây lúa kháng thuốc trừ cỏ là một vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu vì qua đó, việc xử lý trừ cỏ sẽ thuận lợi hơn nhiều.

Chúng tôi xin trình bày dưới đây một số kết quả nghiên cứu về việc chuyển gen *bar* vào hai giống lúa Việt Nam Nàng Thơm Chợ Đào, Một Bụi và nghiên cứu sự di truyền của gen *bar* đến thế hệ thứ hai.

I - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống lúa

Sử dụng hai giống lúa địa phương của Việt Nam là Nàng Thơm Chợ Đào (do Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp miền Nam cung cấp)

và Một Bụi [(IRGC 79075) do Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI) cung cấp].

Môi trường nuôi cấy mô

Môi trường cơ bản MS (1962) có 2,4-D để tạo và duy trì mô sẹo hoặc có NAA và kinetin ở giai đoạn chuẩn bị tái sinh (tiền tái sinh) và tái sinh cây. Có bổ sung PPT vào môi trường chọn lọc tế bào mô sẹo và môi trường tiền tái sinh, cho hoặc không cho PPT vào môi trường tái sinh.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Sử dụng chủng LBA 4404 (Phòng Nuôi cấy mô tế bào thực vật và Công nghệ di truyền, Viện Nghiên cứu lúa quốc tế, Philippin) chứa plasmid pBIN-BAR mang gen *bar* kháng thuốc trừ cỏ. Vi khuẩn được nuôi cấy, giữ giống trên môi trường thạch LB có chứa 50 mg/l kanamixin và 50 mg/l rifampixin. Chúng được nuôi cấy trên môi trường lỏng AB [2] có các chất kháng sinh nói trên qua đêm trong điều kiện lắc mạnh trước khi được gây nhiễm cho tế bào lúa.

Tạo và duy trì mô sẹo có khả năng sinh phôi

Hạt lúa đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS có 2 mg/l 2,4-D đến khi hình thành các cụm mô sẹo cứng, màu trắng hoặc vàng đục, có hình khối tròn và có khả năng sinh phôi (embryogenic). Chúng được cấy truyền duy trì khoảng 1/2 tháng/lần, để tạo nguyên liệu cho các lần chuyển gen tiếp theo, trong thời hạn tối đa khoảng 2,5 tháng.

Gây nhiễm và nuôi chung mô sẹo lúa với vi khuẩn

Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phôi được gây nhiễm với dịch vi khuẩn (OD=2) có chứa axêtosyringon 200 μ M trong điều kiện có hút chân không (10 phút) và không có hút chân không trong thời gian 20 phút. Sau đó, các cụm

mô được thấm khô nhẹ và được nuôi cấy cũng trên môi trường MS có 2 mg/l 2,4-D và axêtosyringon có nồng độ nói trên trong thời gian 3 ngày.

Chọn lọc

Các cụm mô đã xử lý với vi khuẩn được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng có bổ sung xêfotaxim 500 mg/l và sau đó chúng được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc tế bào MS có 2 mg/l 2,4-D, 3 mg/l PPT. Các cụm mô kháng PPT hình thành được cấy truyền sang môi trường chọn lọc như trên từ 3-4 lần (khoảng 15 ngày/lần).

Giai đoạn chuẩn bị tái sinh cây

Các cụm mô kháng PPT được cấy truyền sang môi trường tiên tái sinh cây MS có 1 mg/l NAA, 2 mg/l kinetin, 500 mg/l xêfotaxim, 3 mg/l PPT.

Tái sinh cây

Các cụm mô kháng PPT tốt được cấy truyền sang môi trường tái sinh cây MS có 0,2 mg/l NAA, 3 mg/l kinetin, 500 mg/l xêfotaxim, có hoặc không có PPT.

Thử *in vitro* khả năng kháng PPT của các cây tái sinh (thế hệ T₀)

Các cây tái sinh có kích thước khoảng 2 cm trở lên được cấy truyền sang môi trường MS không có chất sinh trưởng và có 3 mg/l PPT để theo dõi khả năng sinh trưởng và tạo rễ của cây. Các đầu lá (dài khoảng 1 cm) của các cây nói trên cũng được nuôi cấy trên môi trường MS có 0,5 mg/l BA, 3 mg/l PPT, để theo dõi khả năng mất màu diệp lục trong thời gian 5 ngày.

Tách DNA của lá lúa

Việc tách DNA của lá lúa dùng cho các phân tích PCR và thí nghiệm southern được thực hiện dựa theo tài liệu của Datta và ctv. (1997) [5].

Tách DNA của plasmid vi khuẩn

Sử dụng bộ kit CONCERT High Purity Plasmid, Miniprep System của công ty GIBCO BRL (2000).

Phân tích PCR gen *bar* ở các cây thế hệ T₀, T₁ và T₂

Dùng môi (primers) đặc hiệu cho gen *bar*.

BAR 1: GTC TGC ACC ATC GTC AAC C và BAR 2: GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC. Điều kiện thực hiện PCR: 94°C/5', (94°C/30", 50°C/45", 72°C/30"): 36 chu kỳ và 72°C/5'. Sau đó, chạy điện di DNA trên gel agarosa 1%.

Thử nghiệm enzym PAT ở các cây T₀, T₁ và T₂

Thí nghiệm ghi nhận sự hiện diện của enzym PAT ở cây chuyển gen, qua việc sử dụng đồng vị phóng xạ [1-¹⁴C] axêtyl-coenzym A, được thực hiện dựa theo kỹ thuật của De Block và ctv. (1987).

Thử tính kháng PPT của các cây T₀, T₁ và T₂ ngoài vườn ươm

Các đầu lá (dài khoảng 1,5 cm) của các cây khoảng 1 tháng tuổi ngoài vườn ươm được nuôi cấy trên môi trường MS (không có vitamin) có 0,5 mg/l BA, có 3 mg/l PPT, để theo dõi khả năng mất màu diệp lục, cũng trong thời gian 5 ngày theo phương pháp của Wang và ctv. (1997). Tính kháng PPT của các cây ngoài vườn ươm cũng đã được nghiên cứu bằng cách quét PPT nồng độ cao 1 g/l (có bổ sung tween 20 0,1%) trên phiến lá và theo dõi khả năng kháng PPT trong vòng 7 ngày. Ngoài ra, các cây T₁, T₂ còn được kiểm tra bổ sung trước đó về khả năng kháng PPT (giai đoạn *in vitro*) bằng cách khử trùng hạt và nuôi cấy trên môi trường MS không chất sinh trưởng có 3 mg/l PPT, để theo dõi khả năng sống sót của cây sau 7 ngày.

Thí nghiệm southern blot cây T₀

10 µg DNA/mẫu cây được cắt bằng enzym giới hạn *Sma* I. Sau đó, các mẫu DNA được chạy điện di trên gel agarosa 1% và chúng được chuyển qua màng Hybond N⁺ (Amersham). Probe gen *bar* được chuẩn bị qua việc sử dụng plasmid pUBA (Phòng Nuôi cấy mô tế bào thực vật và Công nghệ di truyền, Viện Nghiên cứu lúa quốc tế, Philippin) mang gen *bar* kích thước 0,8 kb, enzym *Sac* I, *Bam*H I và bộ kit Rediprime DNA Labelling System (Amersham Arlington Heights, IL.). Băng DNA nhận biết có kích thước 0,63 kb.

Thử tính kháng thuốc diệt cỏ thương mại BastaTM của cây T₀, T₁

Các cây từ 1-1,5 tháng tuổi ngoài vườn ươm được phun dịch thuốc Basta có nồng độ hoạt chất diệt cỏ 1 g/l và hiện tượng cháy lá

được theo dõi trong thời gian 7 ngày.

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi nhận thấy sự chọn lọc tế bào bằng PPT qua xử lý chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium* tương đối khó thực hiện hơn việc chọn lọc bằng hygromycin vì tỷ lệ nhiễm lại của vi khuẩn tương đối cao, mặc dù mô sẹo qua nuôi chung với vi khuẩn đã được rửa khá kỹ (số liệu cá nhân). Theo chúng tôi, sự kết hợp giữa kháng sinh xêfotaxim (500 mg/l) và hygromycin (50 mg/l) có thể đã diệt vi khuẩn tốt hơn tổ hợp xêfotaxim (500 mg/l) và PPT (3 mg/l). Vì vậy, việc rửa thật kỹ mô sẹo sau khi nuôi chung với vi khuẩn là khâu mang tính quyết định. Chúng tôi đã nhận được 12 cây chuyển gen ở giống Nàng Thơm Chợ Đào, 4 cây chuyển gen ở giống Một Bụi.

Theo Wang và ctv. (1997), việc sử dụng đầu lá để kiểm tra tính kháng PPT là một phương pháp rất hữu hiệu. Các thí nghiệm thử tính kháng PPT của chúng tôi trên các cây T₀ (hình I), T₁ và T₂ ở hai giống thí nghiệm cũng cho kết quả phù hợp với các tác giả nêu trên. Trong thời gian 5 ngày, trên môi trường có PPT 3 mg/l, các đầu lá của cây chuyển gen vẫn giữ được màu xanh diệp lục; ngược lại, đầu lá của cây đối chứng bị cháy vàng và héo. Qua tìm hiểu sự phân ly của gen *bar* bằng phương pháp này ở một số cây thế hệ T₁, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ giữa số mẫu lá còn giữ được màu xanh lục và số mẫu lá bị cháy vàng là khoảng 3:1 (hình L). Ảnh hưởng của PPT tương tự được ghi nhận ở trường hợp quét PPT trên cây T₀ (hình J), T₂ (hình M). Qua thí nghiệm dùng hạt của cây T₁ (từ 1 dòng chọn lọc) để thử tính kháng PPT, bước đầu nhận thấy sự sống sót của các cây thế hệ này theo tỷ lệ 3:1 (3 cây sống sót: 1 cây chết). Ở trường hợp thế hệ T₂, tất cả các hạt đều nảy mầm và sinh trưởng tốt trên môi trường có 3 mg/l PPT. Ở đối chứng, tất cả các hạt đều không có khả năng nảy mầm và chết trên môi trường này.

Kết quả phân tích PCR gen *bar*, song song với thí nghiệm dùng đầu lá, cho thấy ở các cây chuyển gen T₀ có sự hiện diện của băng DNA có kích thước 0,45 kb (hình A, B) và tỷ lệ giữa số cây có hoặc không có băng 0,45 kb (ở thế hệ T₁) khoảng 3:1 (hình C). Các cây chuyển gen T₂

kháng PPT từ một dòng T₁ chọn lọc đều có băng DNA 0,45 kb mong đợi qua phân tích PCR.

Các thí nghiệm về enzym PAT ở cây T₀ của hai giống nói trên (hình D, E) cũng cho thấy có kết quả phù hợp với thí nghiệm kiểm tra tính kháng bằng đầu lá và phân tích PCR. Sự hiện diện của vết dương tính điển hình ở quần thể cây T₁ qua phân ly cũng có tỷ lệ 3:1 (hình F, G) và tỷ lệ là 100% đối với các cây T₂ từ một dòng T₁ chọn lọc ở cả hai giống Nàng Thơm Chợ Đào và Một Bụi.

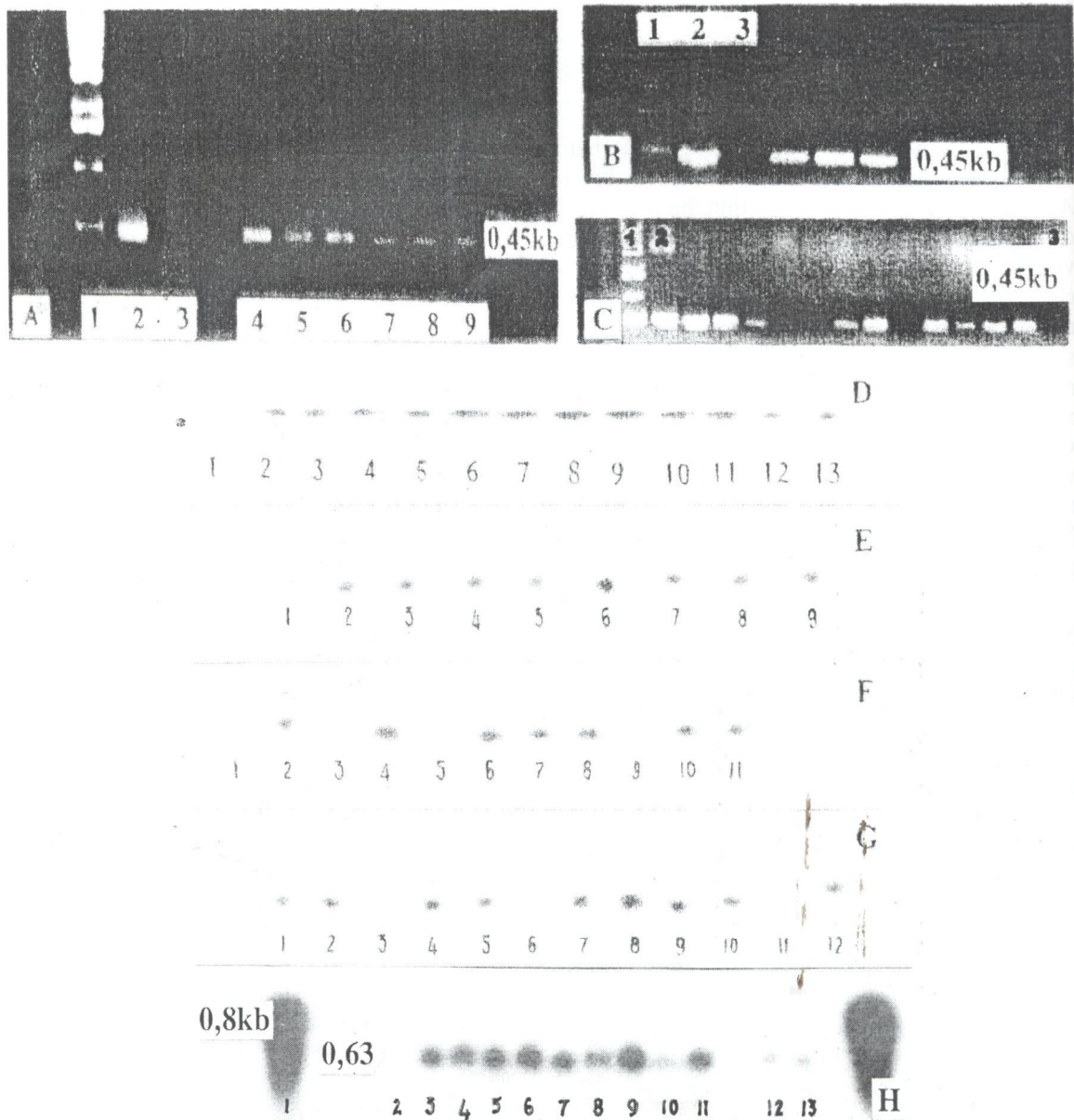
Về thí nghiệm southern blot, do điều kiện về thời gian nên chúng tôi chỉ thực hiện thí nghiệm trên cây thế hệ T₀. Kết quả cho thấy chỉ có một băng DNA duy nhất 0,63 kb ở cả hai giống Nàng Thơm Chợ Đào và Một Bụi (hình H). Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới về vấn đề số lượng các copy của gen chuyển thường là không nhiều ở các cây chuyển gen nhận được bằng phương pháp sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Sau khi phun thuốc trừ cỏ Basta trên cây T₀ và cây T₁ chọn lọc, toàn bộ cây đối chứng bị chết sau 5-7 ngày, cây chuyển gen vẫn xanh tốt, sinh trưởng bình thường (hình K). Ở một số trường hợp kháng trung bình, các lá cây hơi bị vàng nhưng nhìn chung cây vẫn duy trì khả năng sinh trưởng sau đó.

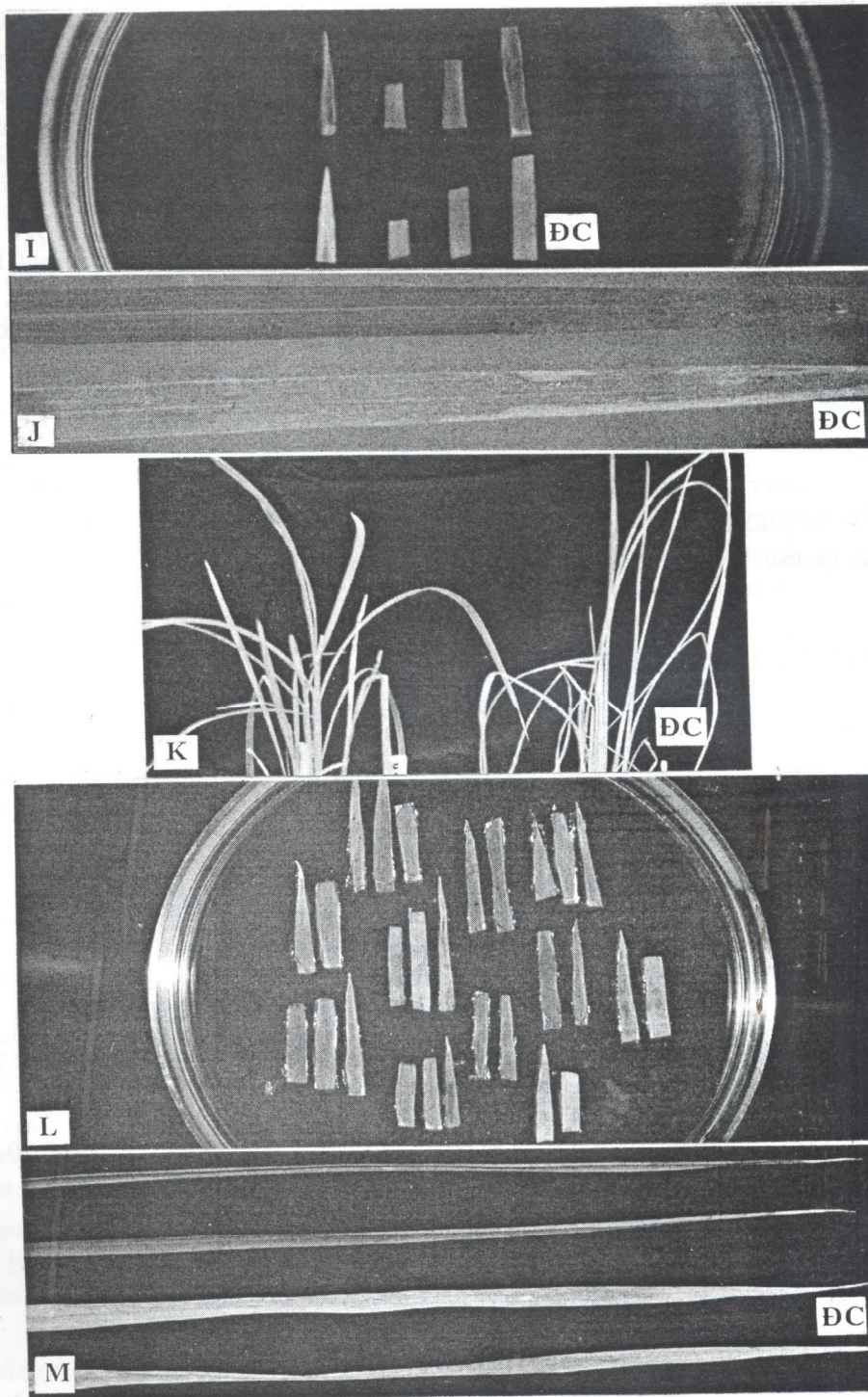
III - KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhận được một số dòng lúa Việt Nam thuộc hai giống Nàng Thơm Chợ Đào và Một Bụi mang gen *bar* có khả năng kháng cao đối với thuốc trừ cỏ thương mại Basta nhờ sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Chúng tôi đã kiểm tra ở mức độ phân tử sự hiện diện của gen *bar* ở bộ gen của cây thế hệ T₀, và kiểm tra bước đầu sự hiện diện của gen này ở các cây T₁ và T₂. Qua một số phân tích bước đầu, chúng tôi nhận thấy có sự phân ly theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1 ở thế hệ thứ nhất và các cây T₂ (từ một dòng chọn lọc kháng thuốc trừ cỏ thế hệ T₁) vẫn duy trì khả năng kháng thuốc trừ cỏ. Các dòng lúa nói trên có nhiều hứa hẹn trong ứng dụng vào công tác chọn giống.

Ghi chú: Xin chân thành cảm ơn Tổ chức Rockefeller (USA) đã tài trợ cho nghiên cứu này



- A. Phân tích PCR gen *bar* ở giống lúa Nàng Thơm Chợ Đào. 1: thang DNA chuẩn 1 kb. 2: đối chứng dương tính (plasmid; 0,45 kb). 3: cây đối chứng. 4-9: cây chuyển gen (0,45 kb).
- B. Phân tích PCR gen *bar* ở giống lúa Một Bụi. 1: thang DNA chuẩn 1 kb. 2: đối chứng dương tính (plasmid; 0,45 kb). 3: cây đối chứng. Các trường hợp có băng DNA: cây chuyển gen (0,45 kb).
- C. Phân tích PCR gen *bar* ở một số cây lúa Nàng Thơm Chợ Đào thế hệ T_1 . 1: thang DNA chuẩn 1 kb. 2: đối chứng dương tính (plasmid; 0,45 kb). 3: cây đối chứng. Các trường hợp còn lại có hoặc không có băng DNA: sự phân ly theo tỷ lệ 3:1 ở một số cây thí nghiệm.
- D. Thử nghiệm enzyme PAT ở một số cây lúa Nàng Thơm Chợ Đào. 1: cây đối chứng. 2-13: cây chuyển gen.
- E. Thử nghiệm enzyme PAT ở một số cây lúa Một Bụi. 1: cây đối chứng. 2-9: cây chuyển gen.
- F. Sự phân ly 3:1 qua thử nghiệm enzyme PAT ở một số cây lúa Nàng Thơm Chợ Đào thế hệ T_1 .
- G. Sự phân ly 3:1 qua thử nghiệm enzyme PAT ở một số cây lúa Một Bụi thế hệ T_1 .
- H. Thí nghiệm lai southern đối với gen *bar*. 1: đối chứng dương tính (plasmid; 0,8 kb). 2: cây đối chứng. 3-11: cây lúa chuyển gen Nàng Thơm Chợ Đào (0,63 kb). 12, 13: cây lúa chuyển gen Một Bụi (0,63 kb).



I. Thí nghiệm dùng đầu lá để thử tính kháng PPT (Một Bụi). ĐC: cây đối chứng.
 J. Thí nghiệm quét PPT trên lá (Nàng Thơm Chợ Đào). ĐC: cây đối chứng.
 K. Thí nghiệm phun thuốc trừ cỏ Basta trên cây lúa Một Bụi. ĐC: cây đối chứng.
 L. Sự phân ly gen *bar* 3:1 ở thế hệ T_1 qua thí nghiệm dùng đầu lá để thử tính kháng PPT (Một Bụi).
 M. Thí nghiệm quét PPT trên lá cây lúa Nàng Thơm Chợ Đào thế hệ T_2 . ĐC: cây đối chứng.

(Mã số RF 99001#728). Cũng xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Văn Uyển, TS. Swapan Kumar Datta, TS. Karabi Datta, TS. Niranjana Baisakh, TS. Norman Oliva, Mark Arboleda, Lina Torrizo, Editha Abrigo [Viện Nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI), Philippin] đã nhiệt tình giúp đỡ trong việc thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao J. và cs., 1992: Plant Cell Reports, 11: 586-591.
2. Chilton M. D. và cs., 1974: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 3672-3676.
3. Christou P., Tameria L. F., Kofron M., 1991: Bio/Technology, 9: 957-962.
4. Datta S. K. và cs., 1992: Plant Molecular Biology, 20: 619-629.
5. Datta S. K. và cs., 1997: Production and molecular evaluation of transgenic rice plants. IRRI Discussion Paper Series No. 21. International Rice Research Institute.
6. De Block M. và cs., 1987: The EMBO Journal, 6 (9): 2513-2518.
7. Dekeyser R. và cs., 1989: Plant Physiol., 90: 217-223.
8. Lin E. và cs., 1995: Bio/Technology, 13: 686-691.
9. Thompson C. J. và cs., 1987: EMBO Journal, 6 (9): 2519-2523.
10. Vasil V. và cs., 1992: Bio/Technology, 10: 667-674.
11. Wang M. B., Waterhouse P. M., 1997: Biology Reporter, 15: 209-215.

DEVELOPMENT OF SOME TRANSGENIC RICE LINES CONTAINING THE HERBICIDE RESISTANCE GENE *BAR* AND STUDY ON INHERITANCE OF THIS *BAR* GENE UP TO THE T₂ GENERATION

NGUYEN HUU HO

SUMMARY

The commercially important rice cultivars Nang Thom Cho Dao and Mot Bui have been transformed via *Agrobacterium tumefaciens*. The embryogenic calli were infested and co-cultivated with the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 containing *bar* gene for herbicide resistance. We have obtained 12 transgenic plants of Nang Thom Cho Dao cultivar and 4 transgenic plants of Mot Bui cultivar. The southern and PCR analyses confirmed the presence of the *bar* gene in all plants. The leaf tip assay, leaf paint assay for PPT resistance and the assay for phosphinothricin acetyltransferase (PAT) activity, were also realized. All transgenic plants were fully resistant to application of commercial herbicide Basta™. The analyses of T₁ plants showed that the *bar* gene segregated as a dominant Mendelian trait.

Ngày nhận bài: 20-7-2001