



VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM  
VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP

**BÁO CÁO KHOA HỌC**

**Nghiên cứu phân lập và chuyển gen liên  
quan đến tính chịu hạn vào giống lúa  
Việt Nam**

**Báo cáo viên: NCS. Cao Lệ Quyên**



# Nội dung báo cáo

1

**Đặt vấn đề**

2

**Vật liệu và phương pháp**

3

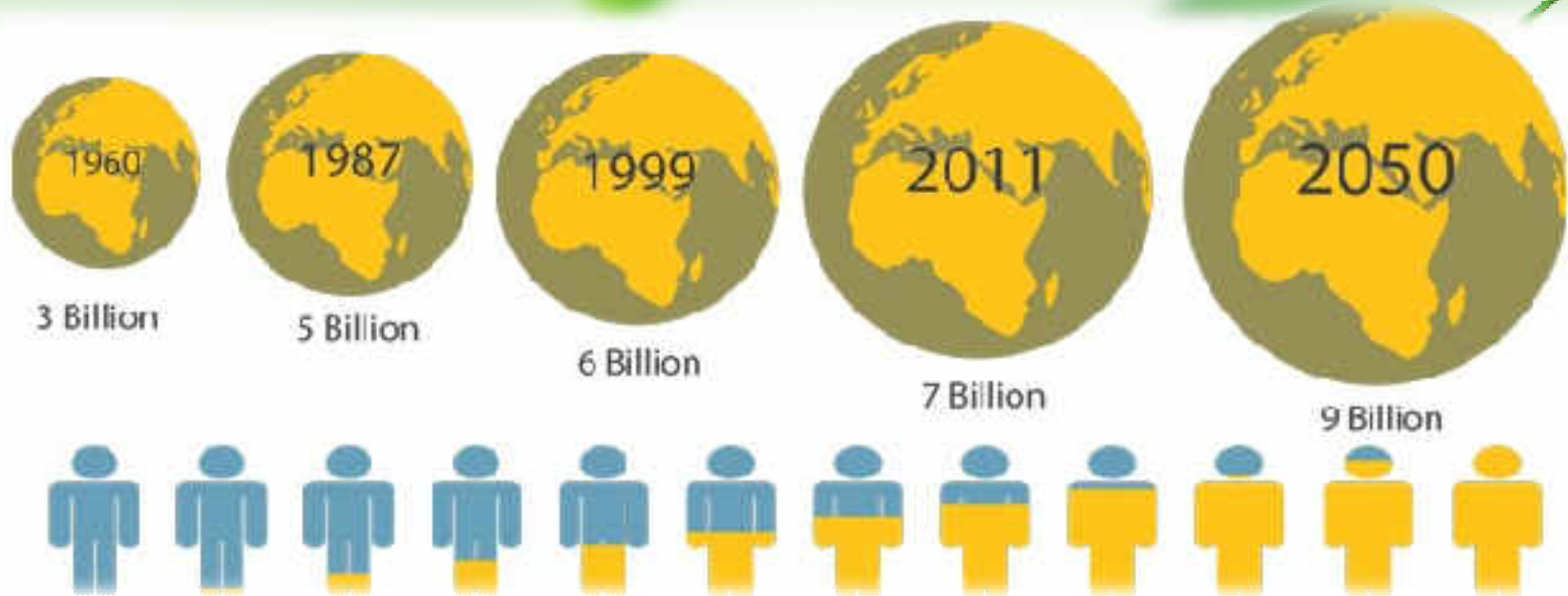
**Kết quả nghiên cứu**

4

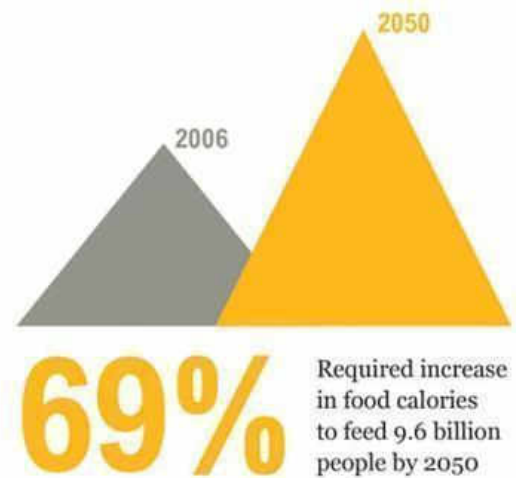
**Kết luận & Kiến nghị**



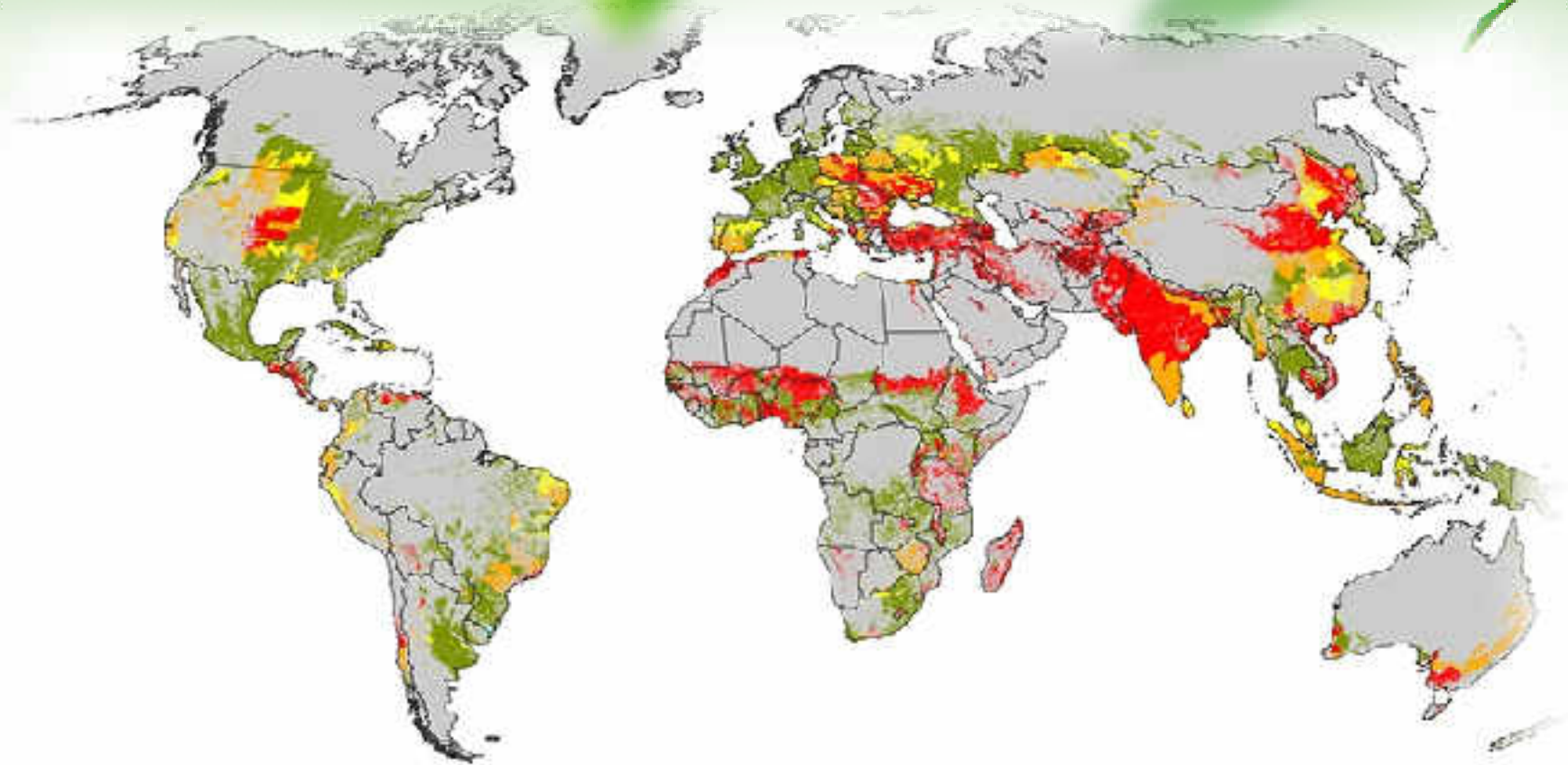
# AN NINH LƯỢNG THỰC CHO LOÀI NGƯỜI



How to feed  
the world in 2050?



# Hạn hán là một trong các yếu tố thách thức thực an ninh lương thực trong thế kỷ 21



**Dự đoán mức độ thiếu nước cho sản xuất nông nghiệp đến năm 2025**

# “Hạn hán, xâm nhập mặn đang vượt quá khả năng chống đỡ của Việt Nam”

Google

hạn hán ở việt nam

All Images

About 1,120,000

Hạn hán miền Nam \ [https://vi.wikipedia.org/wiki](https://vi.wikipedia.org/wiki/Hạn_hán_miền_Nam)

Hạn hán miền Na  
nghiêm trọng diễn  
do hạn ở các tỉnh  
Bối cảnh · Diễn bi  
You've visited this

Hạn hán, xâm nhập \ [vnexpress.net/han-han-xar](http://vnexpress.net/han-han-xar)  
Trung Quốc sẵn s  
Mekong, trong bố  
nghiêm trọng ở c

Việt Nam mất 15.000 [kinhdoanh.vnexpress.net/..](http://kinhdoanh.vnexpress.net/)  
May 31, 2016 - T  
diện tích cây công  
tổng tổng diện tích

Bộ trưởng Bộ NN&PTNT Cao Đức Phát cho biết, tình hình hạn hán, xâm nhập mặn đang vượt quá khả năng chống đỡ của Việt Nam và cần sự hỗ trợ của cộng đồng quốc tế.

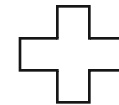
- Toàn bộ Đồng bằng sông Cửu Long đã bị xâm nhập mặn
- Hạn hán ở Nam Trung bộ sẽ khốc liệt hơn
- Hạn, mặn kéo dài: Đường thủy tê liệt, nông dân kiệt quệ
- Nông nghiệp Đồng bằng sông Cửu Long có thể kiệt quệ do xâm nhập mặn
- Khô hạn nhất 30 năm: Cà phê Tây Nguyên đang hóa cùi
- Ngàn tấn hạt chết, vừa thủy sản nguy kịch trong mặn



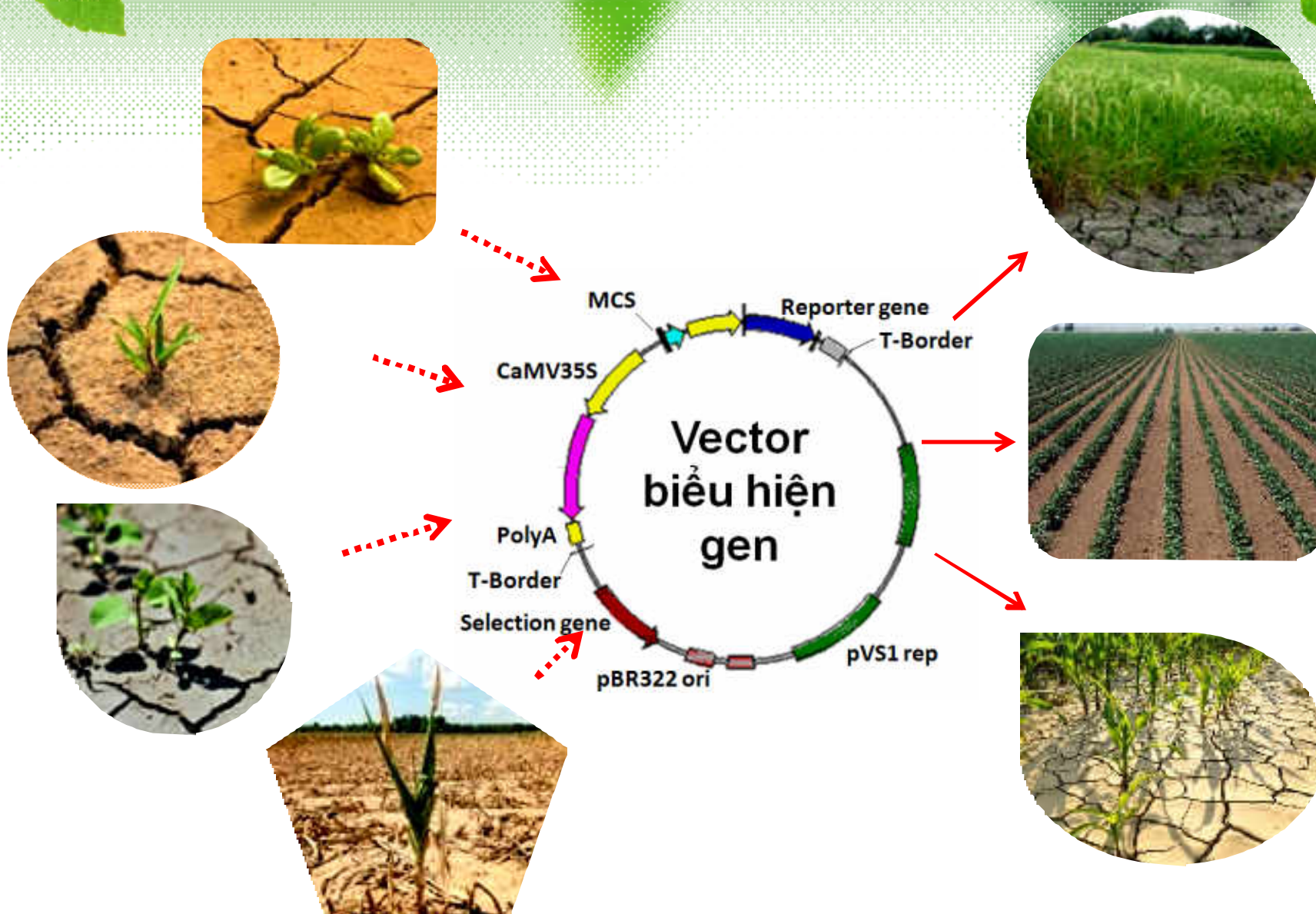
# Giải pháp nào cho nền nông nghiệp hiện nay?



Cải tạo giống

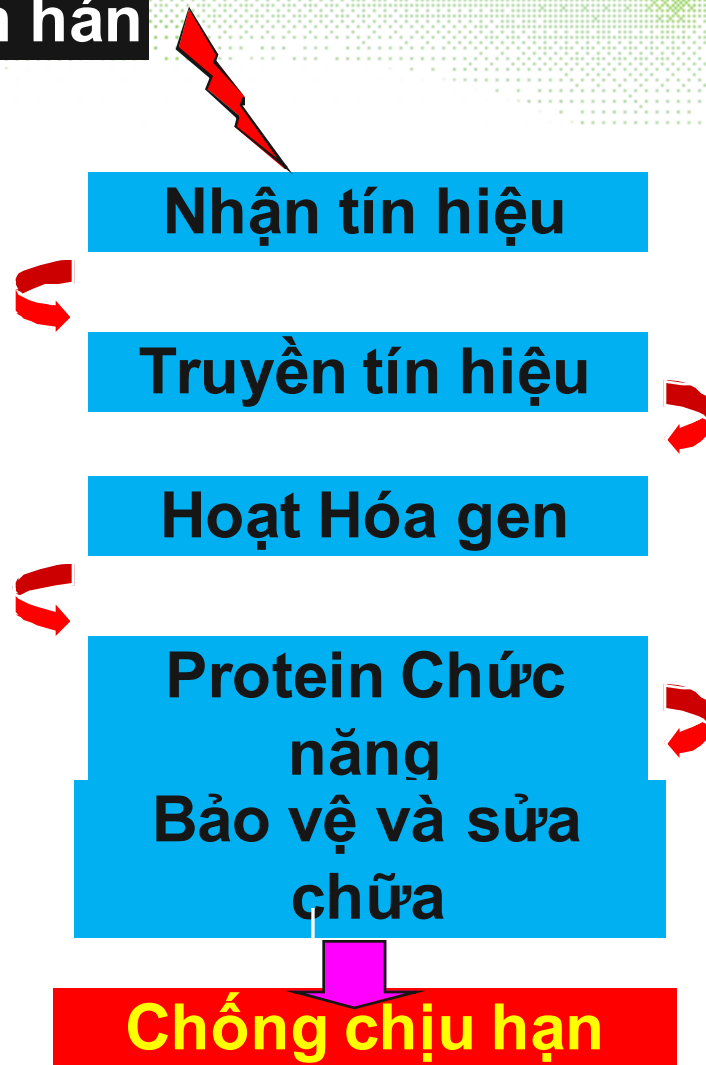


# Tạo giống chuyển gen chịu hạn



# Chuỗi đáp ứng chống chịu hạn ở thực vật

Hạn hán



**Protein dẫn truyền tín hiệu**  
(G protein, kinase)

**Nhân tố phiên mã**  
(DREB, NAC, AREB, MYB, ...)

**Protein chức năng**  
(LEA, chaperones, proteases, transporters, proline...)



# Nhân tố phiên mã đáp ứng hạn ở thực vật

Nhóm AREB/ABF: phụ thuộc ABA

Nhóm AP2/ERF gồm 4 phân nhóm DREB, Rav, ERF ...

Nhóm NAC: nhóm nhân tố phiên mã lớn nhất ở thực vật

Nhóm bZIP, MYB, Zinc fingers, HD-Zip protein ...

# Nhân tố phiên mã đáp ứng hạn ở lúa

AP2/ERF	<i>SodERF3</i>	<i>Saccharum officinarum</i> L. cv Ja60-5	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. SR1	Dehydration/Multiple stress	Trujillo et al., 2008
	<i>GmERF3</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Dehydration/Multiple stress	Zhang et al., 2009
	<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Glycine max</i>	Dehydration	de Paiva Rolla et al., 2014
	<i>OsDREB1F</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	Drought/Multiple stress	Wang et al., 2008
	<i>GmDREB2A;2</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Glycine max</i>	Dehydration/Multiple stress response	Mizoi et al., 2013
	<i>DREB1/CBF</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	Dehydration	Paul et al., 2015
	<i>FeDREB1</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drought/Multiple stress	Fang et al., 2015
	<i>VrDREB2A</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drought	Chen et al., 2016
	<i>EaDREB2</i>	<i>Erianthus arundinaceus</i>	<i>Saccharum spp. hybrid</i> Co 86032	Drought	Augustine et al., 2015
	<i>AtDREB2A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Glycine max</i>	Drought	Engels et al., 2013
	<i>OsDREB2A</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	Drought	Cui et al., 2011
	<i>SsDREB</i>	<i>Suaeda salsa</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Drought	Zhang X. et al., 2015
	<i>TaDREB2</i> and <i>TaDREB3</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	Drought	Morran et al., 2011
NAC	<i>SNAC1</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	Drought	Hu et al., 2006
	<i>TaNAC2</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drought/Multiple stress	Mao et al., 2012
	<i>OsNAC5</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	Drought	Song et al., 2011
	<i>OsNAC6</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	Dehydration/Multiple stress	Nakashima et al., 2007
	<i>GmNAC20</i> <i>TaNAC69</i>	<i>Glycine max</i> <i>Triticum aestivum</i>	<i>Glycine max</i> <i>Triticum aestivum</i>	Drought Dehydration Tolerance	Hao et al., 2011 Xue et al., 2011

# Nhân tố phiên mã *OsDREB1A*

*Plant Cell Physiol.* 47(1): 141–153 (2006)  
doi:10.1093/pcp/pci230, available online at www.pcp.oupjournals.org  
JSPP © 2006

## Functional Analysis of Rice DREB1/CBF-type Transcription Factors Involved in Cold-responsive Gene Expression in Transgenic Rice

Yusuke Ito<sup>1</sup>, Koji Katsura<sup>1</sup>, Kyonoshin Maruyama<sup>1</sup>, Teruaki Taji<sup>2,6</sup>, Masatomo Kobayashi<sup>3</sup>, Motoaki Seki<sup>2</sup>, Kazuo Shinozaki<sup>2,4,7</sup> and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki<sup>1,4,5,\*</sup>



**WT: 0%**  
**OsDREB: 17-80%**

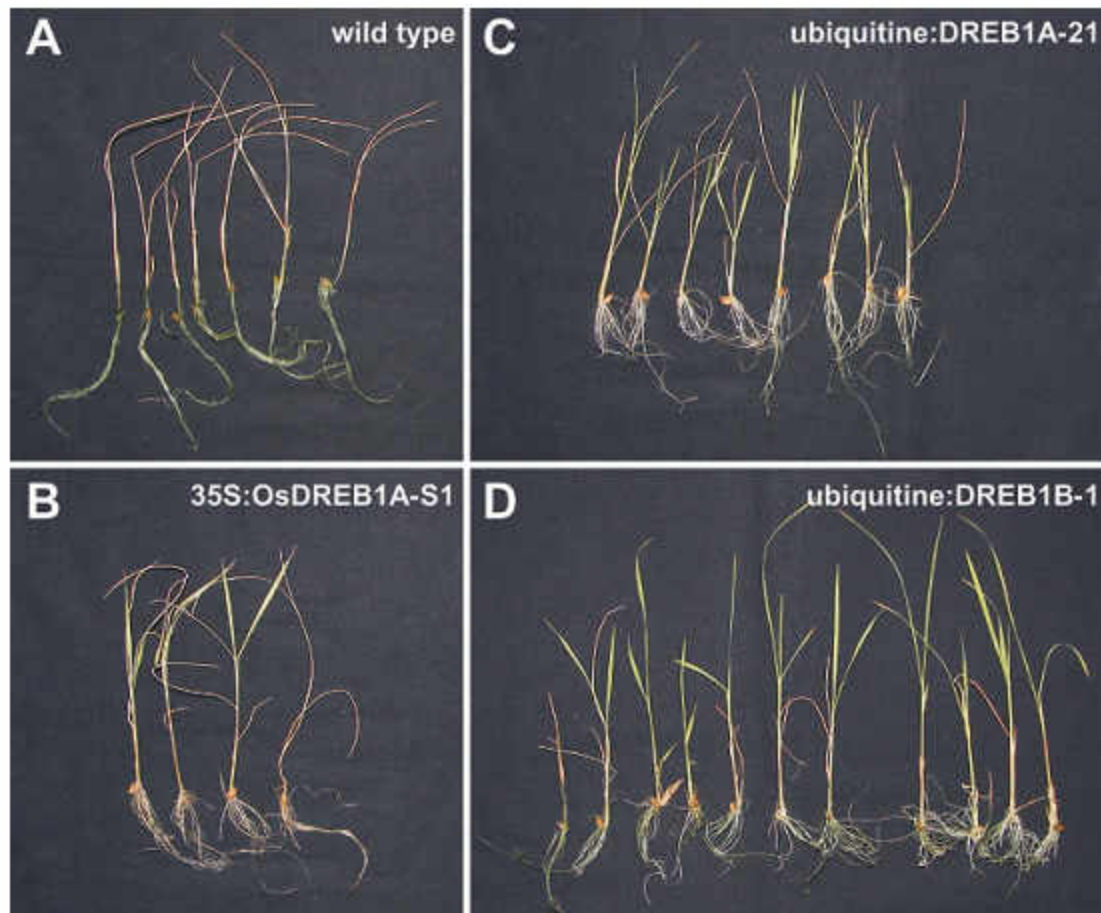


**WT: 5%**  
**OsDREB: 13-83%**



**WT: 0%**  
**OsDREB: 20-60%**

# Nhân tố phiên mã *OsDREB1A*



WT: **16%**  
OsDREB: **57-90%**

# Nhân tố phiên mã *OsDREB2A*

Plant Physiology and Biochemistry 49 (2011) 1384–1391



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)



Research article

Induced over-expression of the transcription factor *OsDREB2A* improves drought tolerance in rice

Meng Cui<sup>a,1</sup>, Wenjiao Zhang<sup>a,1</sup>, Qian Zhang<sup>a</sup>, Zhiqiang Xu<sup>a</sup>, Zhengge Zhu<sup>a,b,\*</sup>, Faping Duan<sup>b</sup>, Ray Wu<sup>b,2</sup>

<sup>a</sup> Hebei Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050016, China

<sup>b</sup> Department of Molecular Biology & Genetics, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA



14 ngày: **52.72%**



28 ngày: **73.36%**

# Mục tiêu nghiên cứu

- ❖ Phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã OsDREB1A/2A liên quan tính chịu hạn trên giống lúa Việt Nam.
- ❖ Tối ưu hóa được qui trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* trên một số giống lúa Việt Nam.
- ❖ Tạo ra được một số dòng lúa chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã có khả năng chống chịu tốt với bất lợi hạn/thiếu nước trong điều kiện phòng thí nghiệm.



# VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP



# Vật liệu

- **Mẫu thực vật:** Tập đoàn 48 giống lúa Việt Nam do Viện KHKT nông lâm nghiệp Miền núi phía Bắc và Trung tâm tài nguyên thực vật cung cấp.
- **Thư viện cDNA** xử lý hạn do Phòng Bệnh học Phân tử cung cấp.
- **Chủng vi khuẩn:** Vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ , chủng *Agrobacterium* LBA4404 do Phòng Bệnh học Phân tử cung cấp
- Vector pBI và các cặp oligo nucleotide (Sigma)
- **Thiết bị:** máy PCR, máy RT-PCR, máy giải trình tự, hệ thống điện di, máy chụp ảnh huỳnh quang, cột sắc ký...
- **Hóa chất** dùng cho sinh học phân tử và nuôi cấy mô tế bào thực vật đảm bảo độ tinh khiết cần thiết



# Phương pháp

- Đánh giá khả năng tạo callus và tái sinh cây lúa
- Nhân bản gen bằng PCR
- Đánh giá số lượng bản sao của gen chuyển: Southern blot, qRT-PCR, tỷ lệ nảy mầm trên Hygromycin
- Biến nạp cấu trúc biểu hiện gen vào lúa
- Tách chiết DNA plasmid, DNA hệ gen, RNA
- Biến nạp vi khuẩn *E. coli*, *Agrobacterium*
- Nhân dòng gen, ghép nối DNA, cắt enzyme giới hạn...
- Đánh giá giá sinh trưởng, phát triển và khả năng chịu hạn của các dòng lúa chuyển gen



# KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU





## Nội dung I

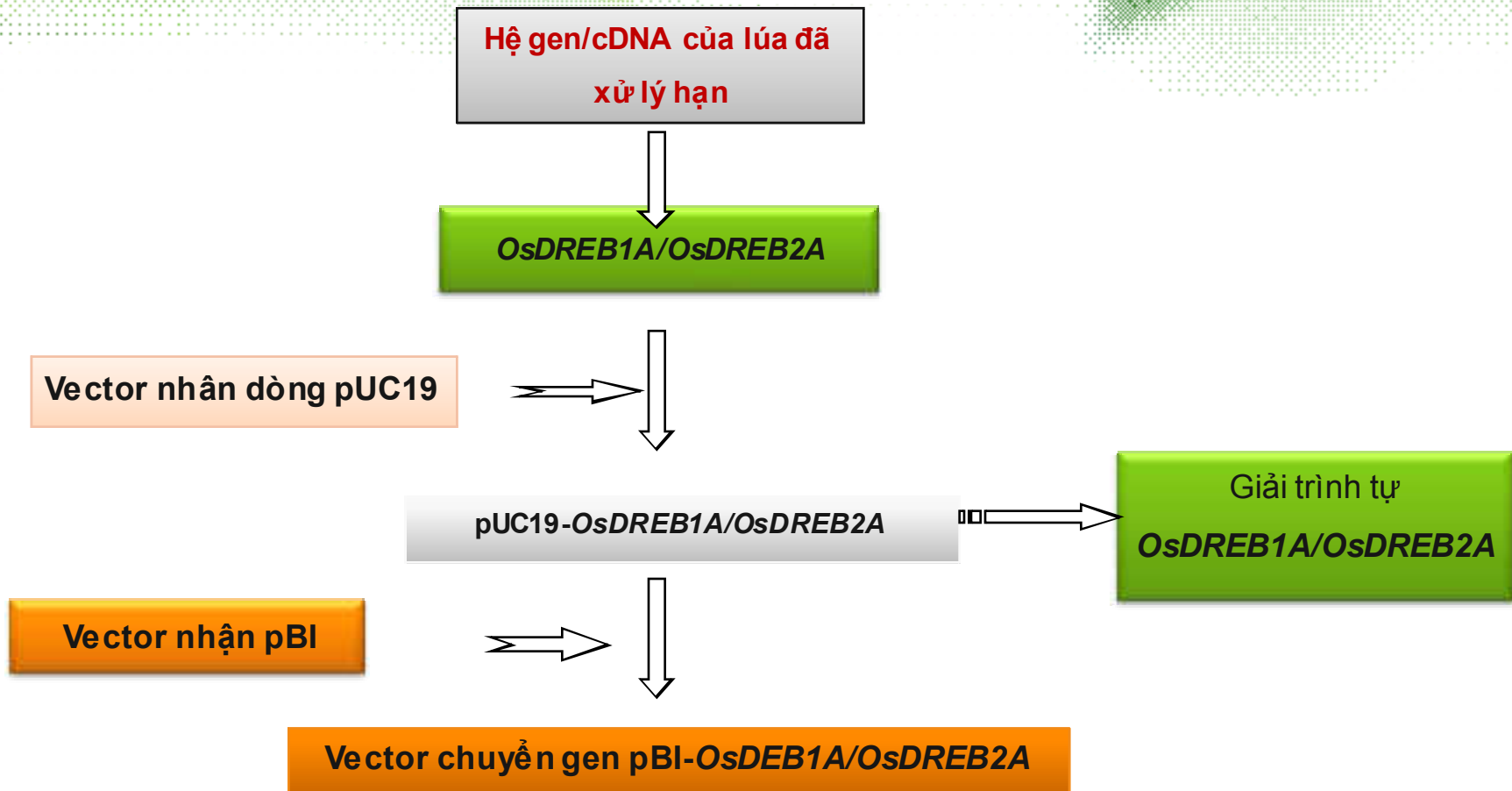
# PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN *OSDREB1A/OSDREB2A*

ĐẶT VẤN ĐỀ

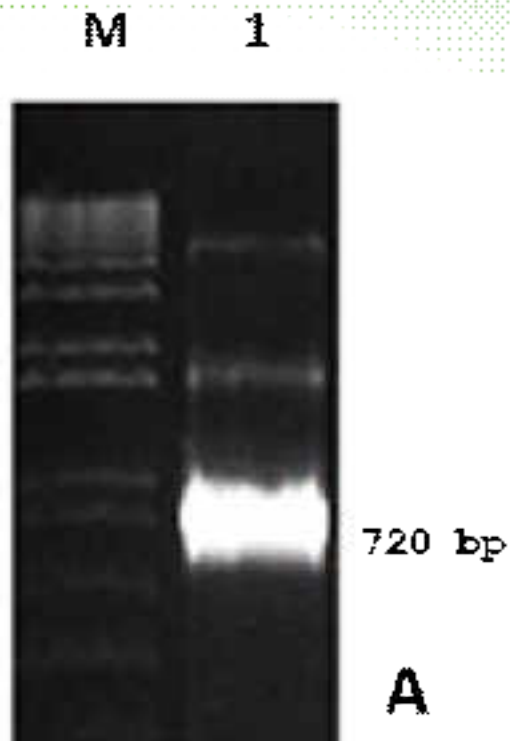
VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ

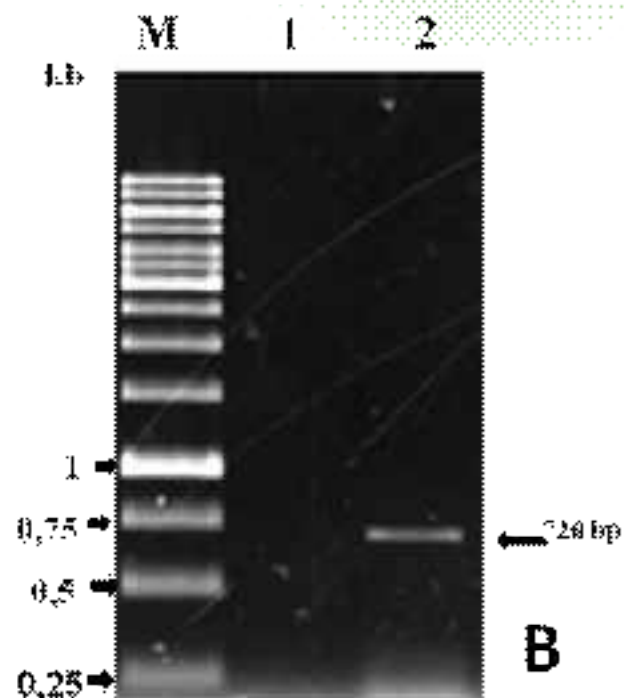
# Sơ đồ phương pháp phân lập gen



# Nhân bản trình tự mã hóa *OsDREB1A*

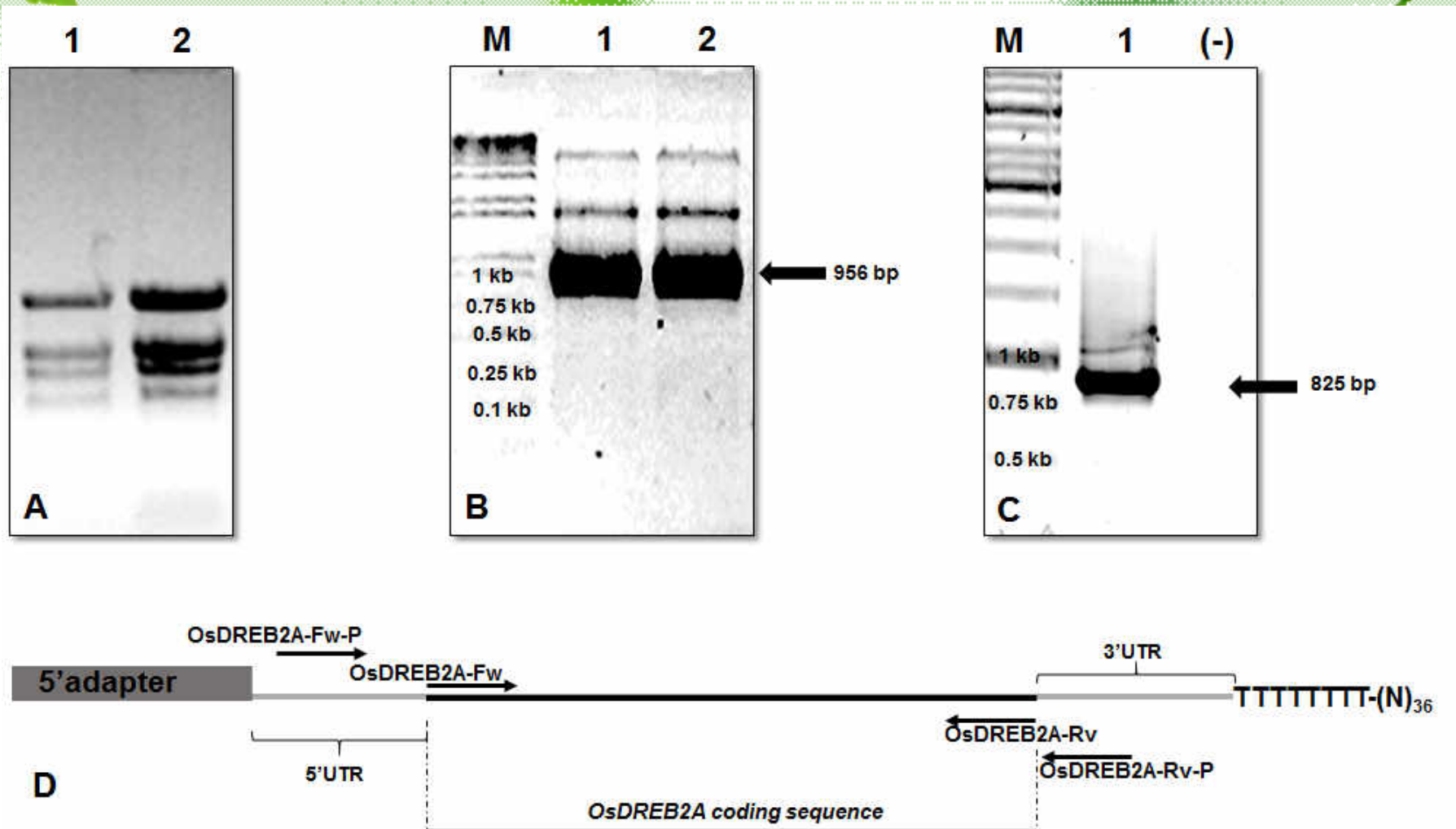


**A:** nhân bản trình tự mã hóa *OsDREB1A* từ cDNA xử lý hạn giống lúa **Mộc tuyền**



**B:** nhân bản trình tự mã hóa *OsDREB1A* từ gDNA của giống lúa **Cườm Dạng**

# Nhân bản trình tự mã hóa *OsDREB2A*



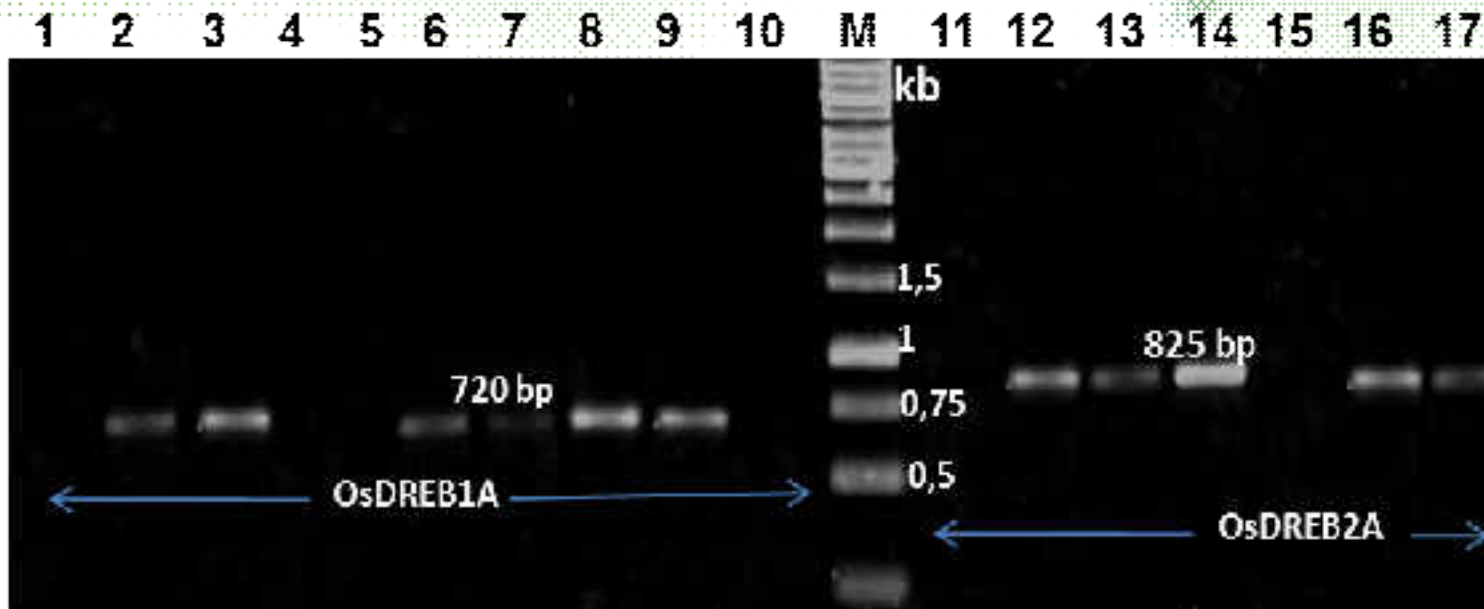
**A:** RNA tổng số

**C:** PCR lồng

**B:** PCR sơ cấp trình tự *OsDREB2A* từ cDNA giống *Cuồng dạng*

**D:** Sơ đồ cặp mồi

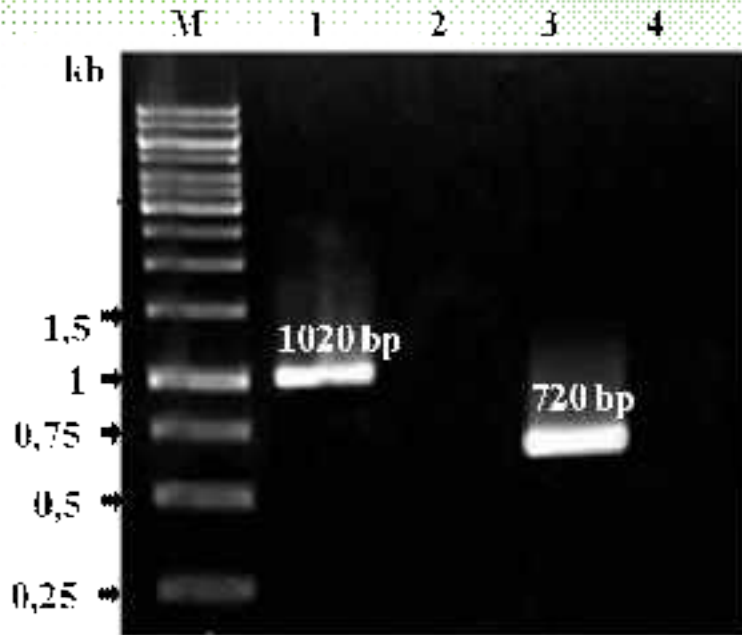
# Dòng hóa trình tự mã hóa OsDREB1A/OsDREB2A



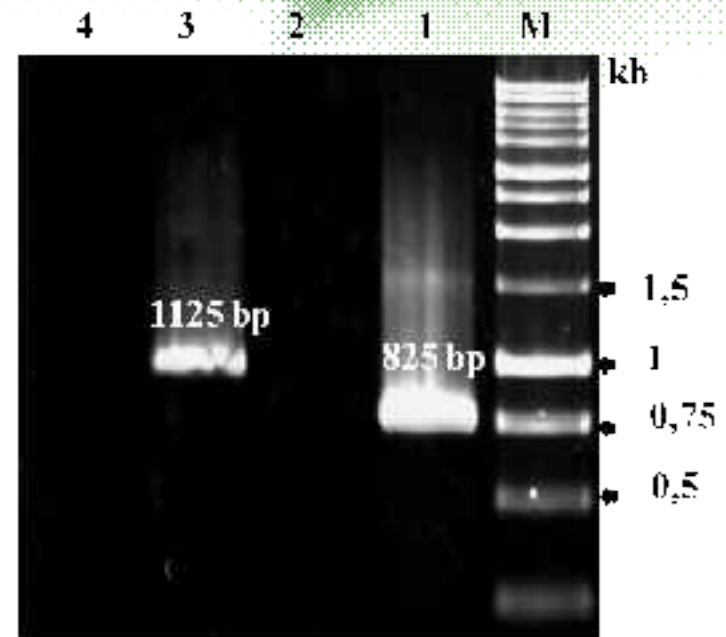
Giếng 1 - 5: Giống **Cườm Dạng**  
Giếng 6-9: Giống **Mộc Tuyền**

Giếng 12-17: Giống **Cườm Dạng**

# Kiểm tra pUC19 tái tổ hợp trình tự mã hóa OsDREB1A/OsDREB2A



*OsDREB1A*

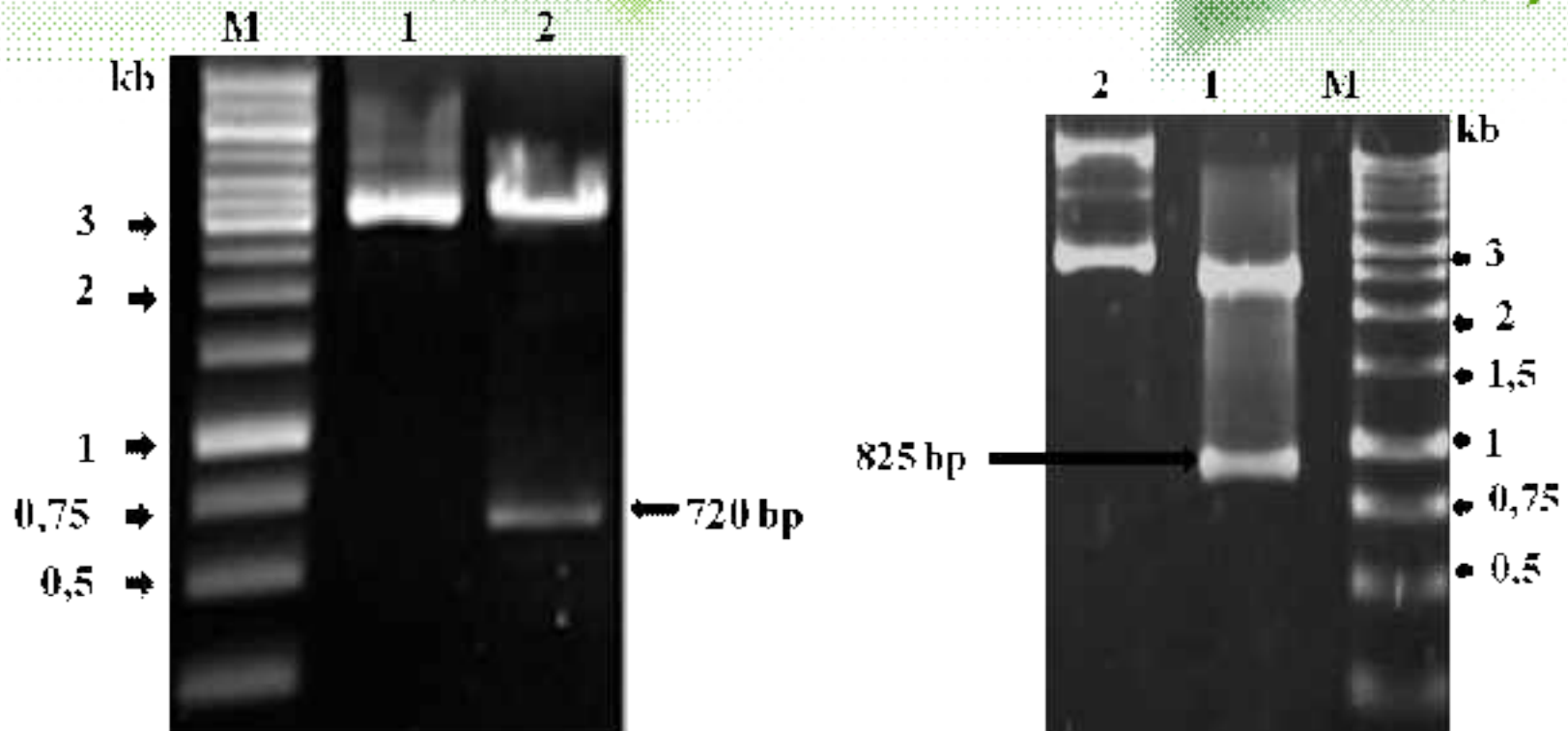


*OsDREB2A*

Kết quả điện di PCR từ khuôn plasmid các vector pUC19 tái tổ hợp sử dụng cặp mỗi gen/vector

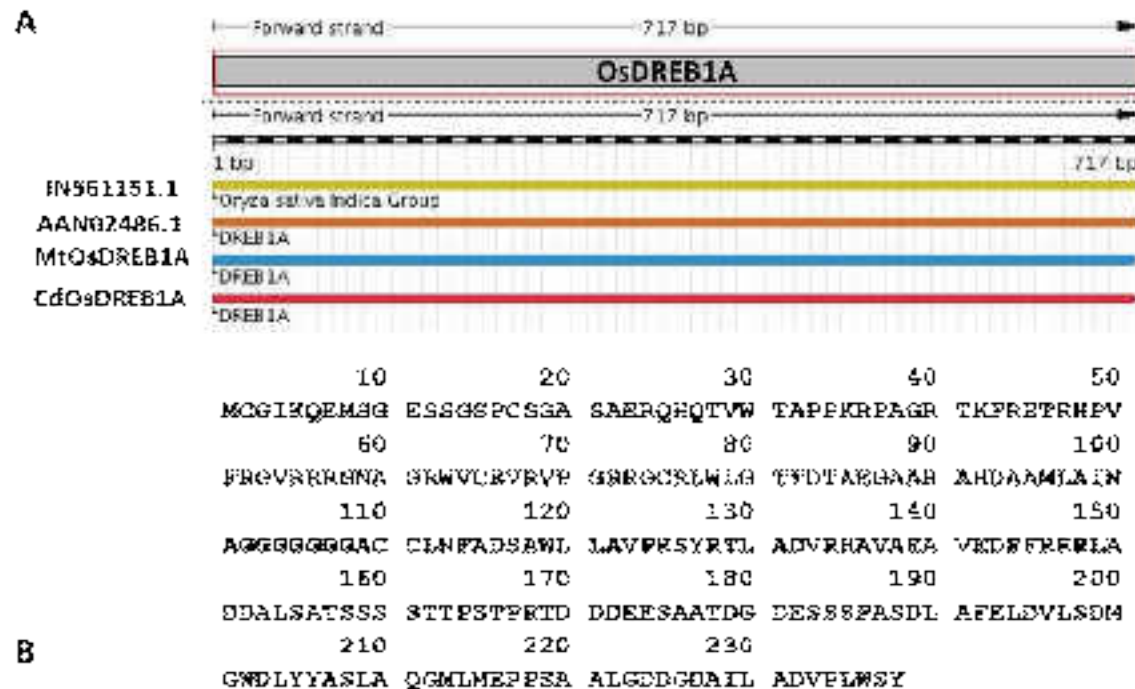
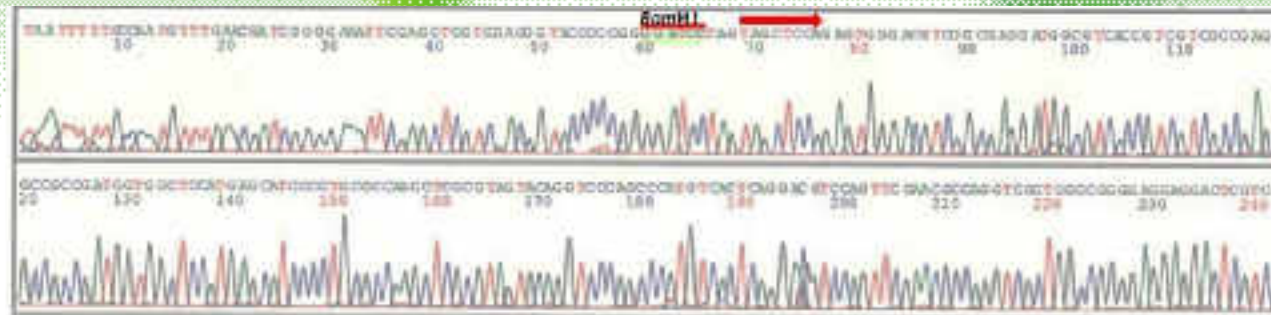


# Kiểm tra pUC19 tái tổ hợp trình tự mã hóa OsDREB1A/OsDREB2A



Điện di sản phẩm cắt giới hạn (*Bam*HI) các vector pUC19 tái tổ hợp

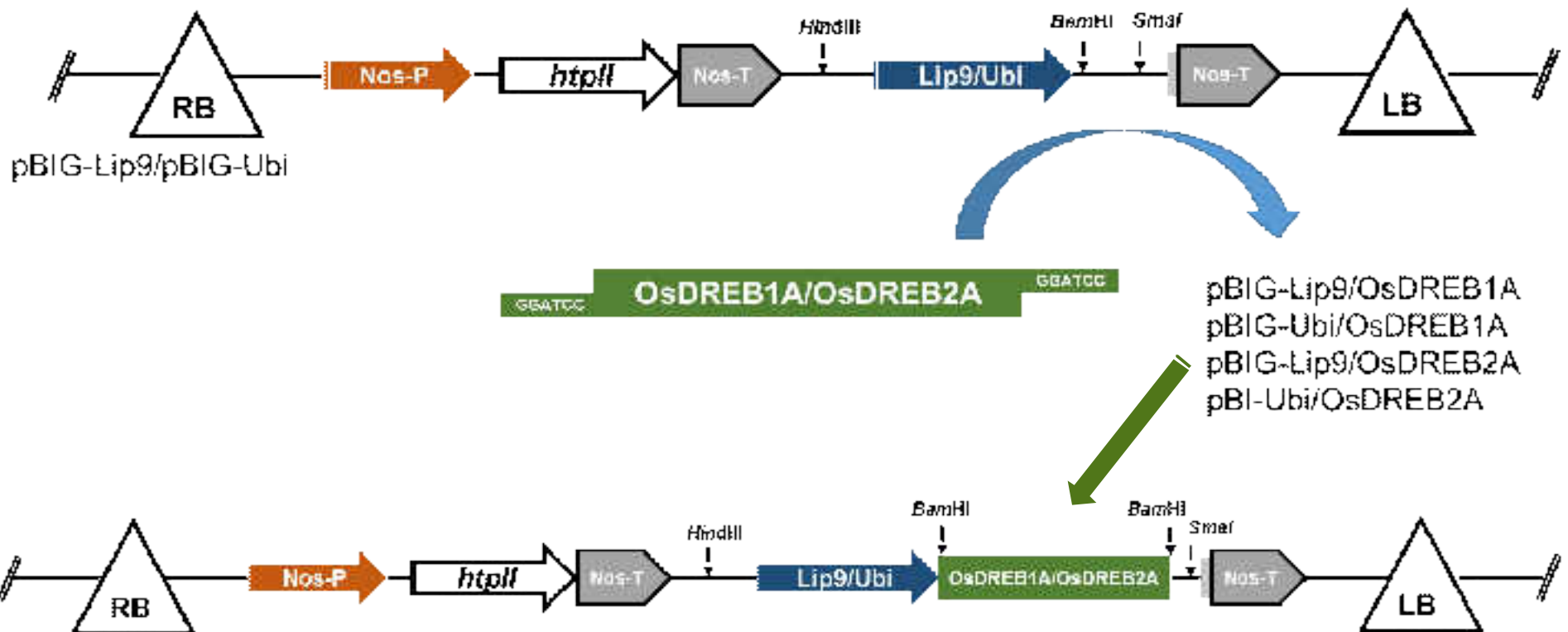
# Kết quả giải trình tự mã hóa *OsDREB1A*



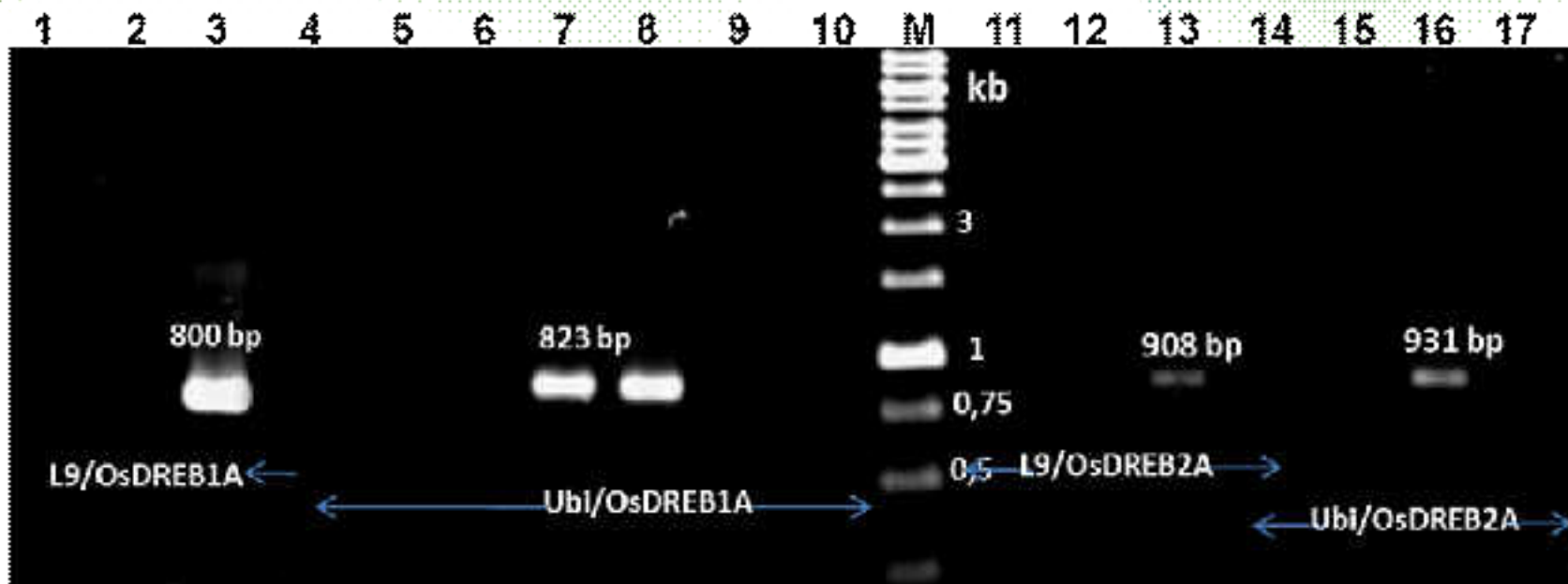
Trình tự  
pUC19-  
*MtOsDREB1A*



# Thiết kế vector chuyển gen pBIG



# Sàng lọc thể biến nạp vector pBI101 tái tổ hợp




Đã thiết kế thành công cấu trúc biểu hiện gen *OsDREB1A/OsDRB2A* điều khiển bởi promoter Ubiquitin & Lip9



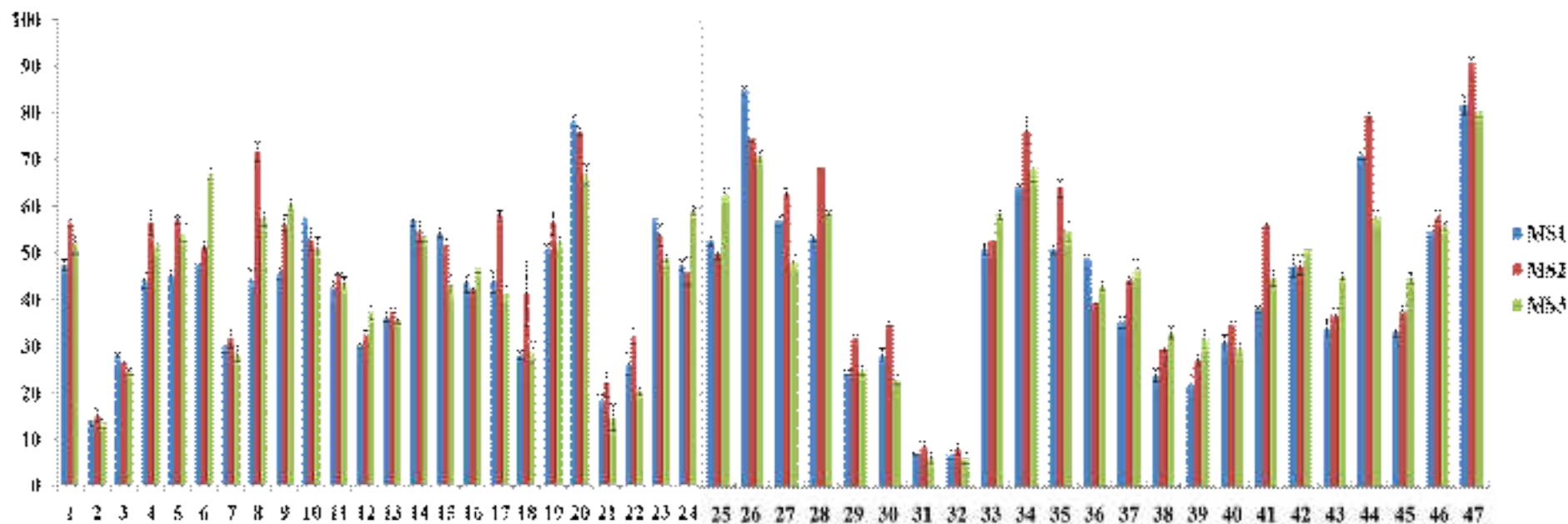
Nội dung II

**NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH CHUYỂN  
GEN VÀO GIỐNG LÚA Ở VIỆT NAM**



# Khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam

Tỷ lệ tạo callus (%)



# Khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam



ĐẶT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ



# Khả năng hình thành callus của tập đoàn giống lúa Việt Nam

Nguồn biến sai	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Giống	110660,7389	46	2459,1275	873,4214	4,8E-272	1,7148
Môi trường	1450,639857	2	725,31993	257,6157	7,58E-64	5,4013
Môi trường và giống	7975,480877	90	88,616454	31,47438	4,6E-105	1,5272
Trong nhóm	777,081	276	2,8155109			
Tổng	120863,9406	413				

**20, 26, 34, 44 và 47** là những giống có tiềm năng tạo callus cao nhất

# Khả năng tái sinh của một số giống lúa Việt Nam

Tỷ lệ tái sinh (%)

100

90

80

70

60

50

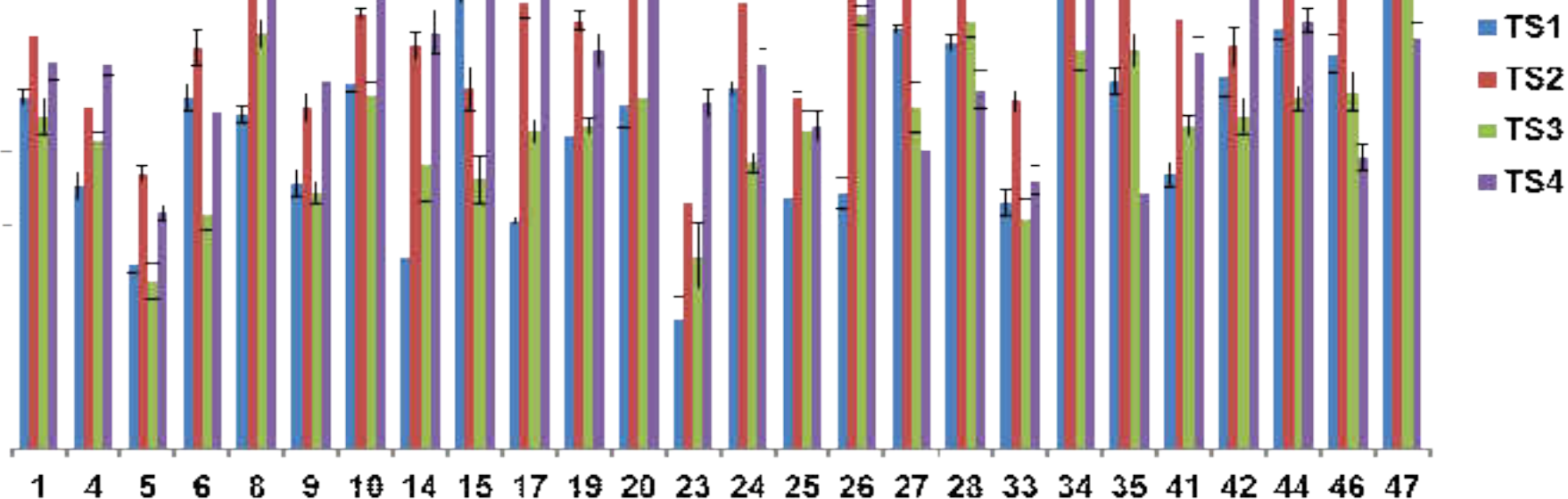
40

30

20

10

0



Giống

ĐẶT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ

# Khả năng tái sinh của một số giống lúa Việt Nam

Nguồn biến sai	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Giống	21757,01	25	906,5421	119,3535	6,7E-105	2,0116
Môi trường	11496,94	3	3832,313	<b>504,5546</b>	5,47E-93	<b>4,4084</b>
Môi trường và giống	12722,17	72	176,6968	23,2635	3,57E-67	1,6146
Trong nhóm	1519,087	200	7,595437			
Tổng	47495,2	299				

**8, 20, 26, 28, 34, 44 và 47 là các giống lúa có tỷ lệ tái sinh trung bình trên 55%**

# Khả năng tái sinh của một số giống lúa Việt Nam



5 giống có tỷ lệ hình thành callus cao và tái sinh tốt là YUNLU103-1B, Chành Trụi, LUYIN46, LP-5M và IR80416-B-152-4 tiếp tục được khảo sát tiếp nhận gen lạ

# Khả năng tiếp nhận gen lạ của 05 giống lúa Việt Nam với một số quy trình

Quy trình	Giai đoạn	Chành trội (%)	YUNLU103-1B (%)	LUYIN46 (%)	LP-5M (%)	IR80416-B-152-4 (%)
<b>Phòng Bệnh học phân tử (I)</b>	Chọn lọc 1	50 ± 2,04	20,33 ± 1,67	15,53 ± 1,78	19,39 ± 1,57	21,53 ± 1,98
	Chọn lọc 2	38 ± 1,53	5,26 ± 1,01	2,34 ± 0,67	4,33 ± 0,51	6,21 ± 0,62
	Tái sinh	27,67 ± 1,62	0	0	0	0
	PCR*	17,33 ± 1,12				
<b>Rahman (2011) (II)</b>	Chọn lọc 1	55,05 ± 2,08	20,13 ± 1,67	10,53 ± 1,75	17,32 ± 1,59	11,06 ± 2,01
	Chọn lọc 2	15,12 ± 1,45	7,05 ± 1,78	1,12 ± 1,98	3,54 ± 1,91	4,57 ± 1,81
	Tái sinh	0	0	0	0	
	PCR*					
<b>Hiei (2008) (III)</b>	Chọn lọc 1	40 ± 1,04	20,33 ± 1,64	15,53 ± 1,45	19,39 ± 1,87	9,34 ± 2,31
	Chọn lọc 2	15,24 ± 2,12	5,19 ± 1,54	4,31 ± 1,37	8,03 ± 1,68	3,47 ± 1,38
	Tái sinh	0	0	0	0	0
	PCR*	0				



Nội dung III

**TẠO GIỐNG LÚA CHÀNH TRỤỊ  
CHUYỂN GEN**



# Cấu trúc biểu hiện *OsDREB1A/OsDREB2A*



*Lip9:* hoạt động cảm ứng điều kiện stress

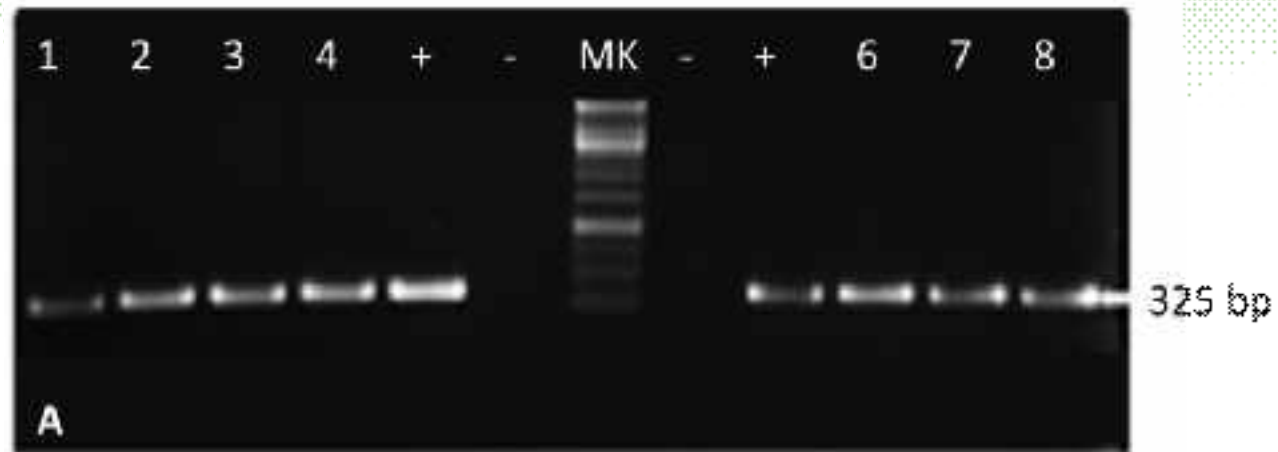
*Ubi:* hoạt động mạnh, liên tục

# Sàng lọc thể biến nạp vector biểu hiện *OsDREB1A/OsDREB2A* trên *A. tumefaciens*

## *OsDREB2A*:

Giếng 1-4: *pBI-Lip9*

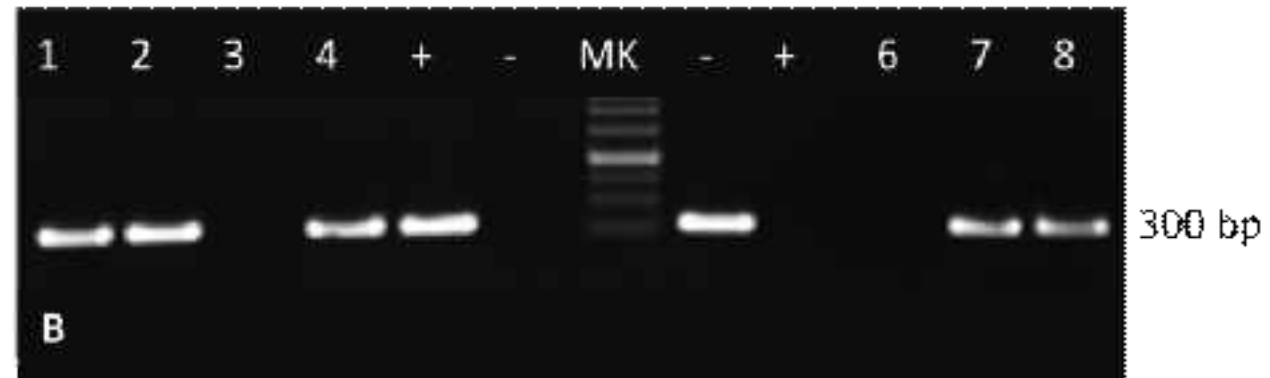
Giếng 6-8: *pBI-Ubi*



## *OsDREB1A*:

Giếng 1-4: *pBI-Lip9*

Giếng 6-8: *pBI-Ubi*

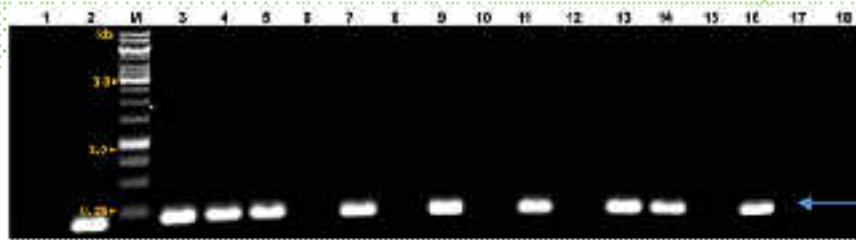




# Biến nạp cấu trúc biểu hiện *OsDREB1A/OsDREB2A* vào lúa Chanh Trụi

Cấu trúc gen chuyển	Hạt lúa	Chọn lọc 1	Chọn lọc 2	Tái sinh
Lip9: <i>OsDREB1A</i>	100	75	33	23
Ubi: <i>OsDREB1A</i>	100	81	38	20
Lip9: <i>OsDREB2A</i>	100	85	28	15
Ubi: <i>OsDREB2A</i>	100	88	34	12
pBIG -Lip9	100	79	30	16
pBCKH - Ubi	100	80	29	13
<b>Tổng</b>	<b>600</b>	<b>488</b>	<b>192</b>	<b>99</b>

# Sàng lọc các dòng Chành Trụi chuyển gen

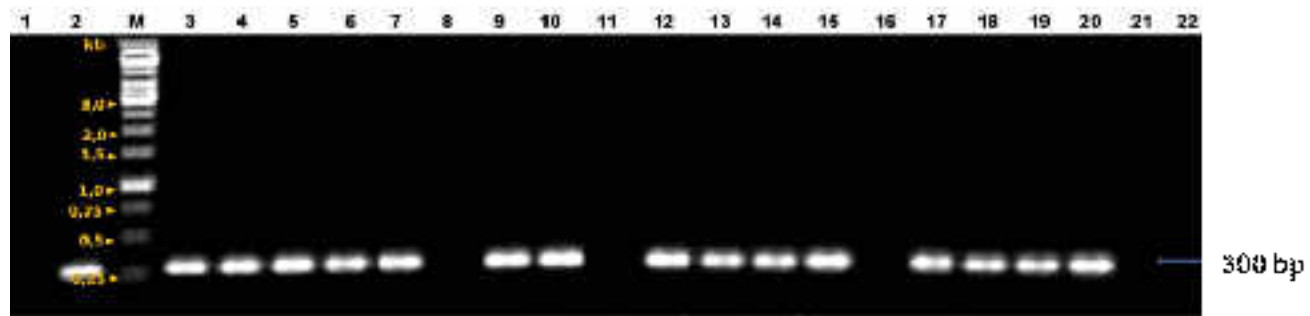
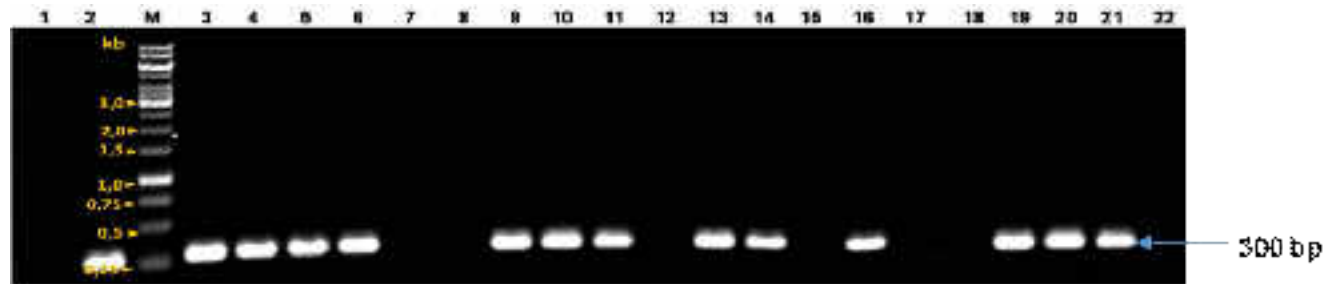


pBIG-Lip9



pBIG-Ubi

pBIG-*OsDREB1A*



ĐẶT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

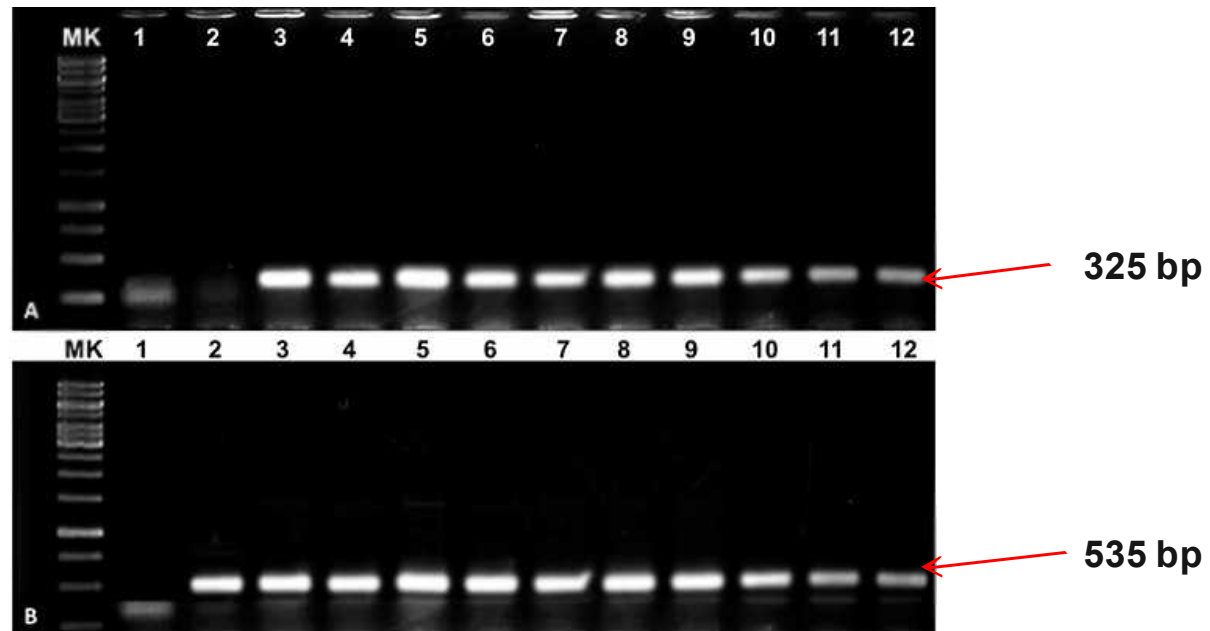
KẾT QUẢ

# Sàng lọc các dòng Chành Trụi chuyển gen

**Lip9 -**  
**OsDREB2A**



**Ubi -**  
**OsDREB2A**



ĐẶT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ

# Sàng lọc cây chuyển gen thế T<sub>0</sub>

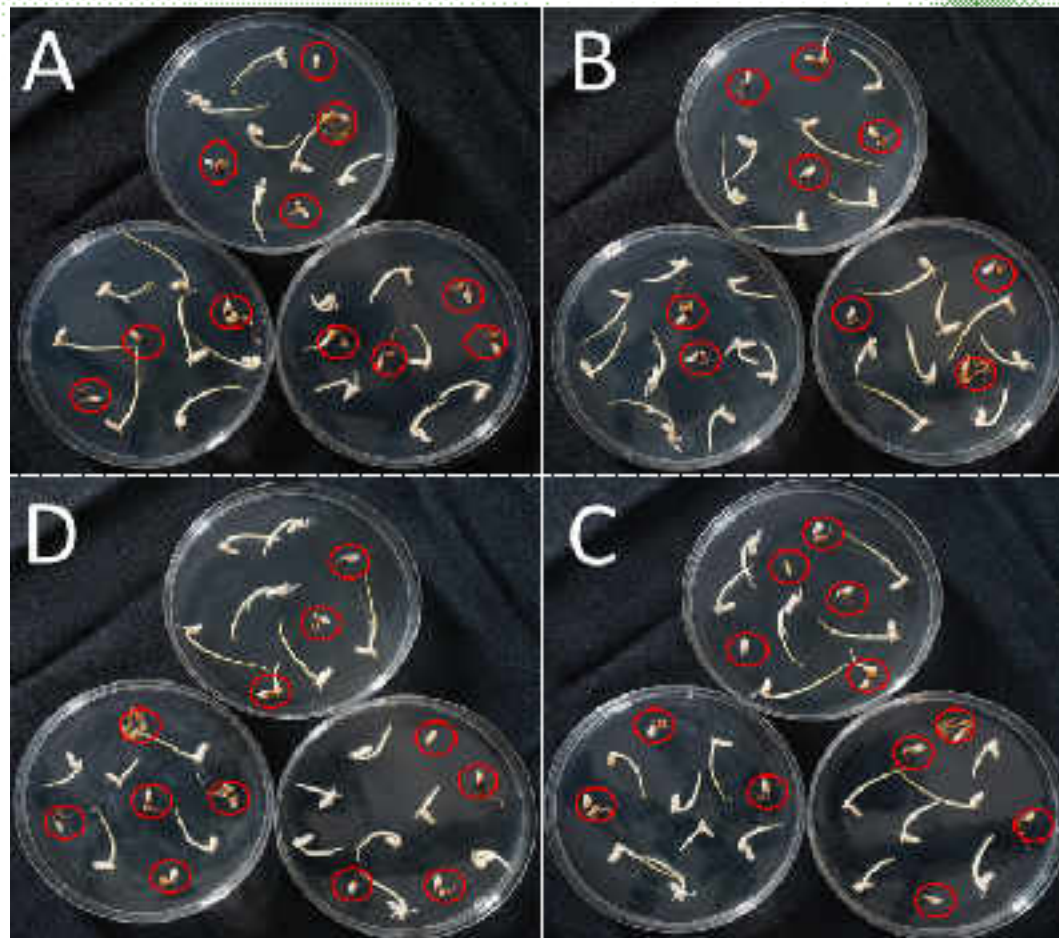
Cấu trúc gen chuyển	Tái sinh	PCR dương tính (htpII-gen chuyển)	Số bản copy qRT-PCR	
			1 bản copy	> 1 bản copy
Lip9: OsDREB2A	15	12	5	7
Ubi: OsDREB2A	12	10	6	4
Lip9: OsDREB1A	23	14	13	6
Ubi: OsDREB1A	20	15	11	4
pBIG-Lip9	16	10	5	5
pBIG-Ubi	13	9	4	5
<b>Tổng</b>	<b>99</b>	<b>70</b>	<b>44</b>	<b>31</b>

# Kết quả theo dõi của các dòng lúa chuyển gen T<sub>0</sub>

Cấu trúc gen chuyển	Bầu đất	Nhà lưới	Trổ bông	Kết hạt	Thu hạt T <sub>1</sub>
Lip9: OsDREB2A	5	4	2	1	1
Ubi: OsDREB2A	6	3	1	1	0
Lip9: OsDREB1A	13	11	9	8	5
Ubi: OsDREB1A	11	9	7	6	4
pBIG-Lip9	5	3	2	0	0
pBIG-Ubi	4	2	1	0	0
<b>Tổng</b>	<b>44</b>	<b>32</b>	<b>22</b>	<b>16</b>	<b>10</b>

**16/44 dòng lúa chuyển gen một bản copy kết hạt  
10 dòng cho thu hạt**

# Kết quả sàng lọc các dòng T<sub>1</sub> chuyển gen

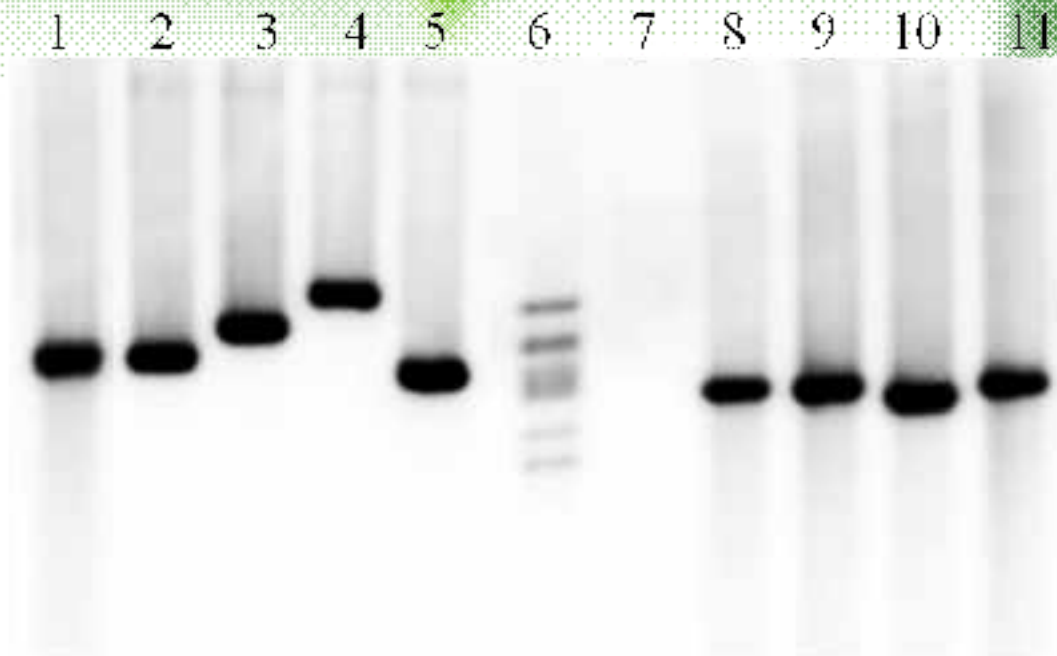


ĐẶT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ

# Kiểm tra số bản copy bằng Southern Blot



Giếng 1-5: **Lip9**-OsDREB1A  
Giếng 8-11: **Ubi**-OsDREB1A

Thu được 9 dòng lúa chuyển gen *OsDREB1A*  
đồng hợp tử (5 dòng Lip9, 4 dòng Ubi)

ĐẠT VẤN ĐỀ

VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ

# Ước tính số lượng bản sao và tình trạng đồng hợp tử các dòng lúa chuyển gen T<sub>1</sub>

		Số hạt kiểm tra	Số hạt nảy mầm trên Hygromycin	PCR dương tính	Kiểu gen	
					Dị hợp (Aa)	Đồng hợp (AA)
<b>Lip9: OsDREB1A</b>	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
<b>Ubi: OsDREB1A</b>	U1	12	7	7	4	3
	U2	7	4	4	3	1
	U3	9	6	6	4	2
	U4	10	6	6	4	2
<b>Tổng</b>		87	54	54	37	17



# Kết quả sinh trưởng của các dòng lúa chuyển gen

Cấu trúc gen		Số cây	Sinh trưởng bình thường	Trở bông	Kết hạt	Thu hạt T <sub>2</sub>
<b>Lip9: OsDREB1A</b>	L1	2	2	1	1	1
	L2	2	2	2	1	1
	L3	2	2	2	2	2
	L4	1	0			
	L5	2	1	1	1	1
<b>Ubi: OsDREB1A</b>	U1	3	2	2	2	2
	U2	1	0			
	U3	2	1	1	0	
	U4	2	2	2	2	2
<b>Tổng</b>		<b>17</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>9</b>

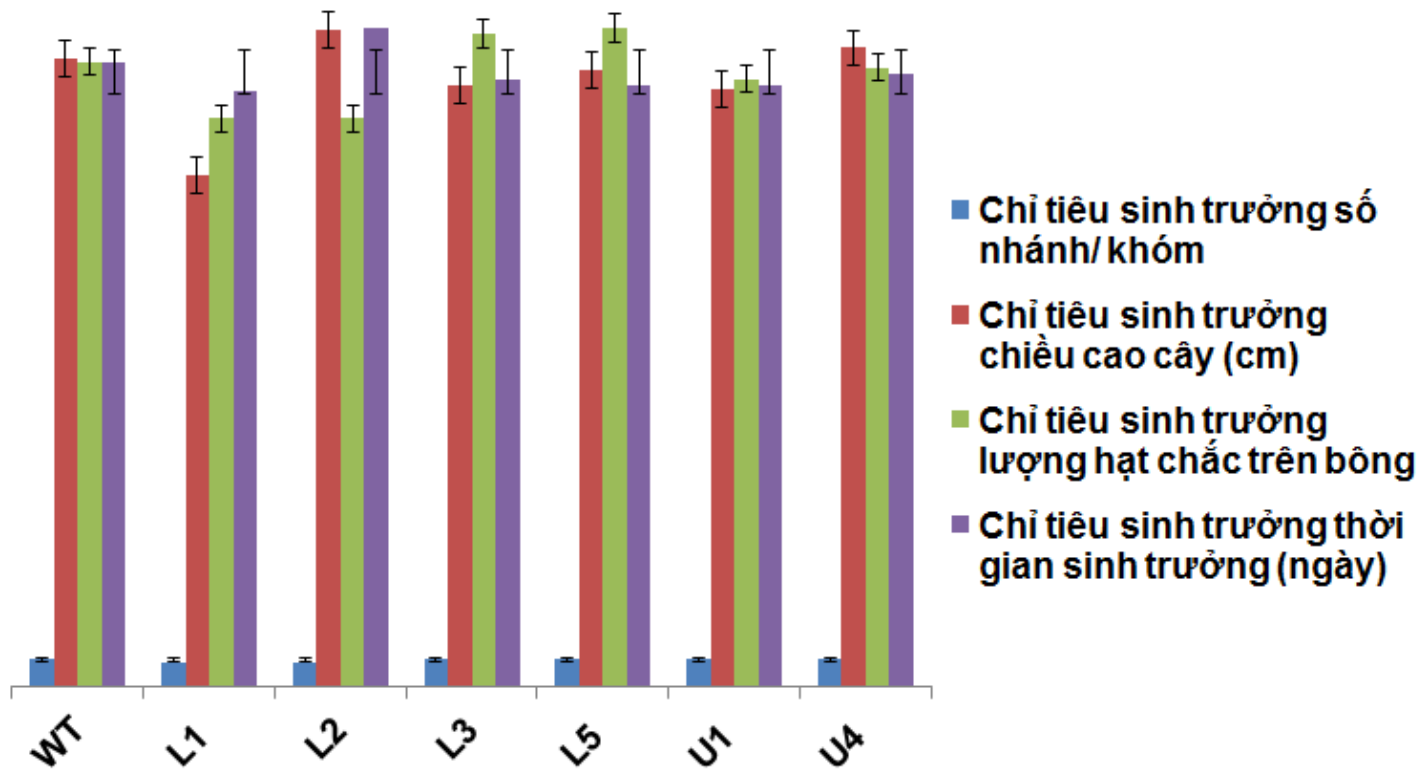


Nội dung IV

# PHÂN TÍCH KIỂU HÌNH CÂY CHUYỂN GEN

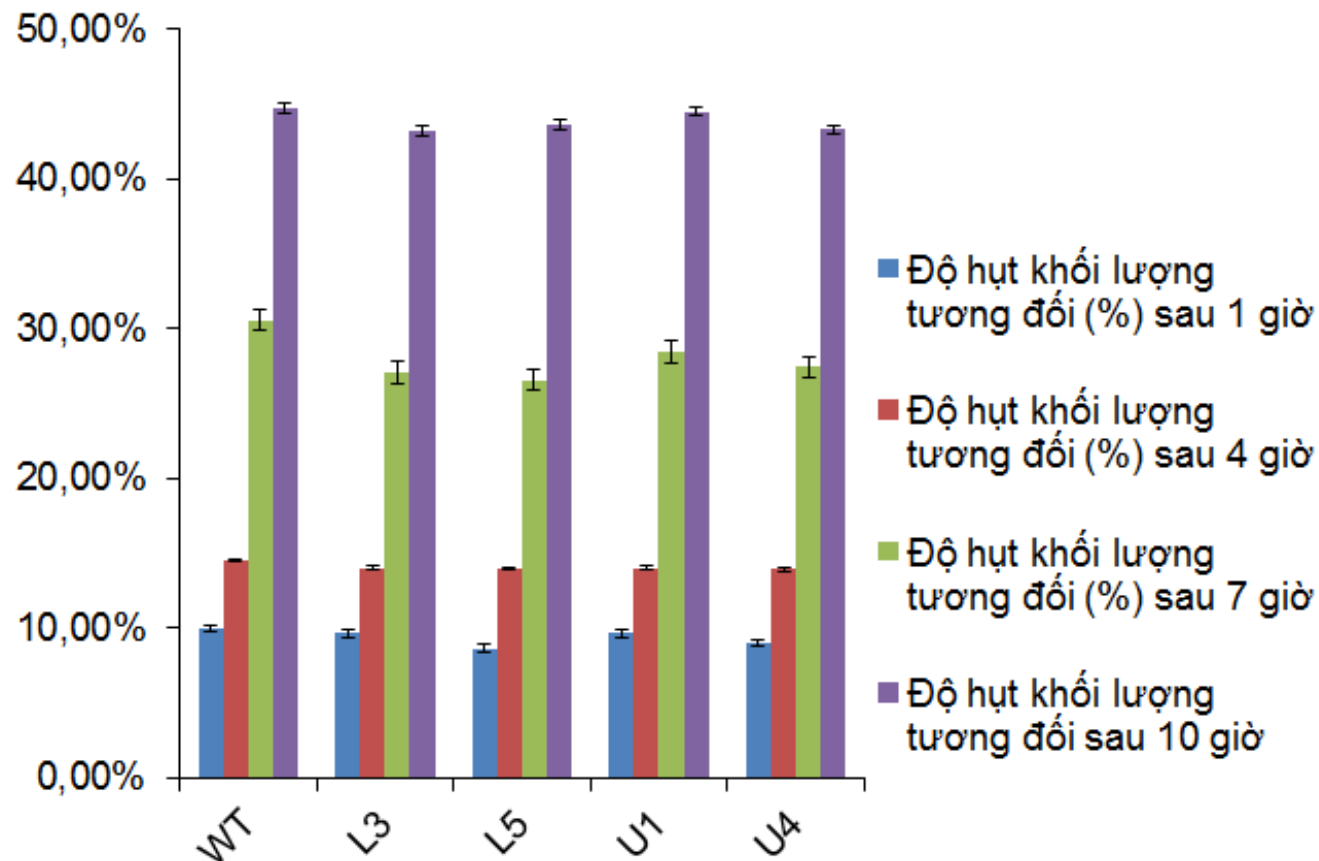


# Đánh giá sinh trưởng và phát triển các dòng chuyển gen T<sub>2</sub>

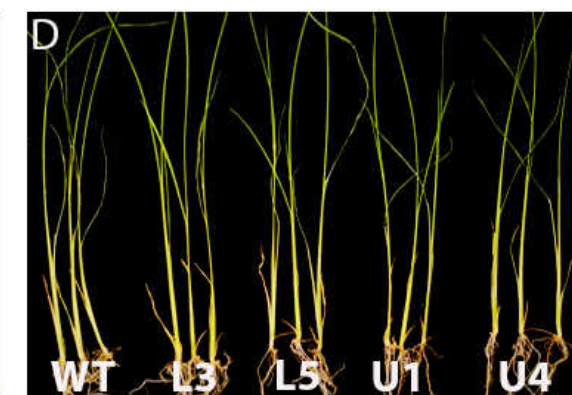
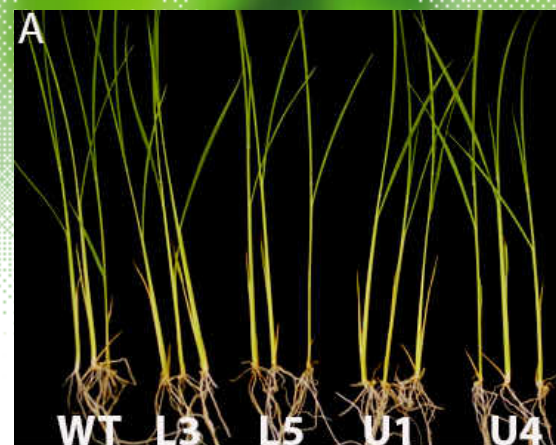


**Thu được 4 dòng lúa chuyển gen (L3, L5, U1 và U4)**

# Đánh giá khả năng giữ nước các dòng chuyển gen $T_2$ khi mất nước cưỡng bức



Khả  
năng  
giữ  
nước  
và  
phục  
hồi

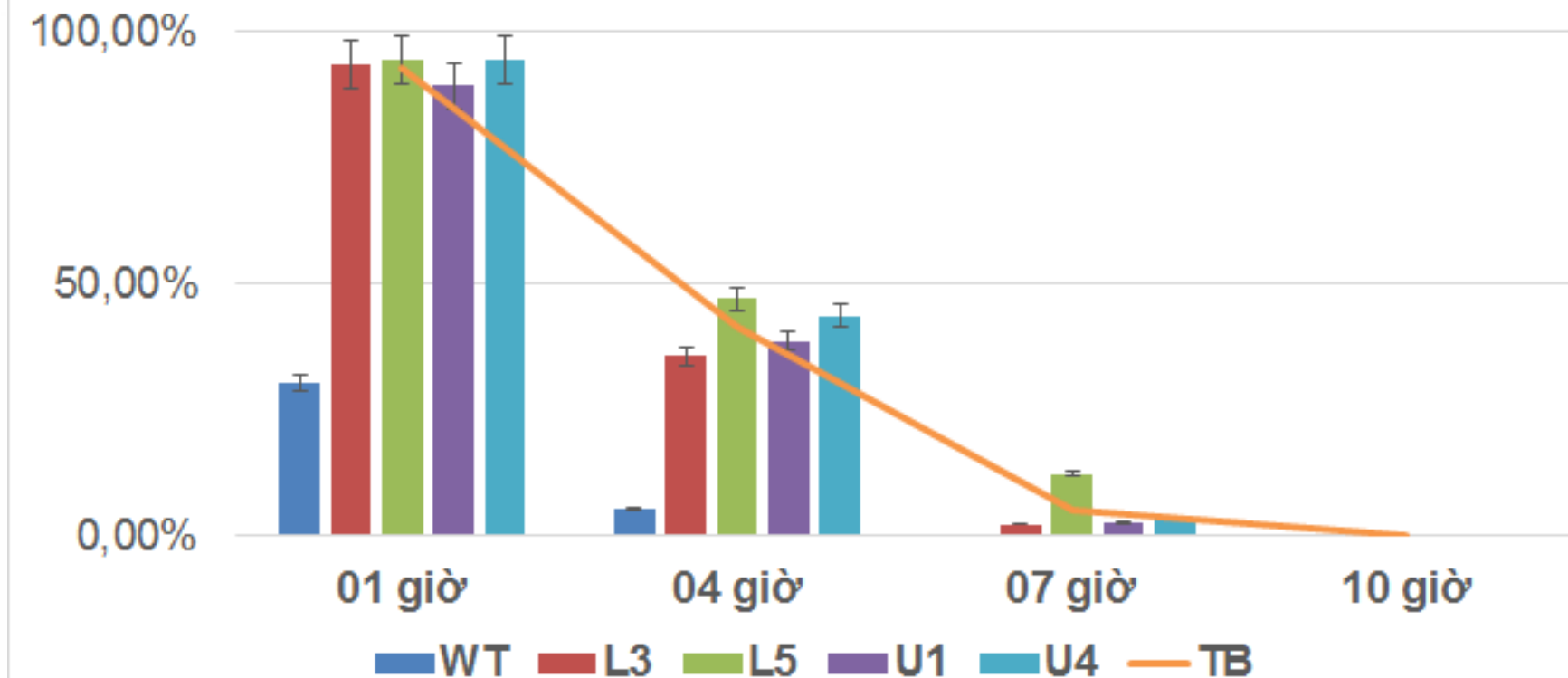


WT L3 L5 U1 U4

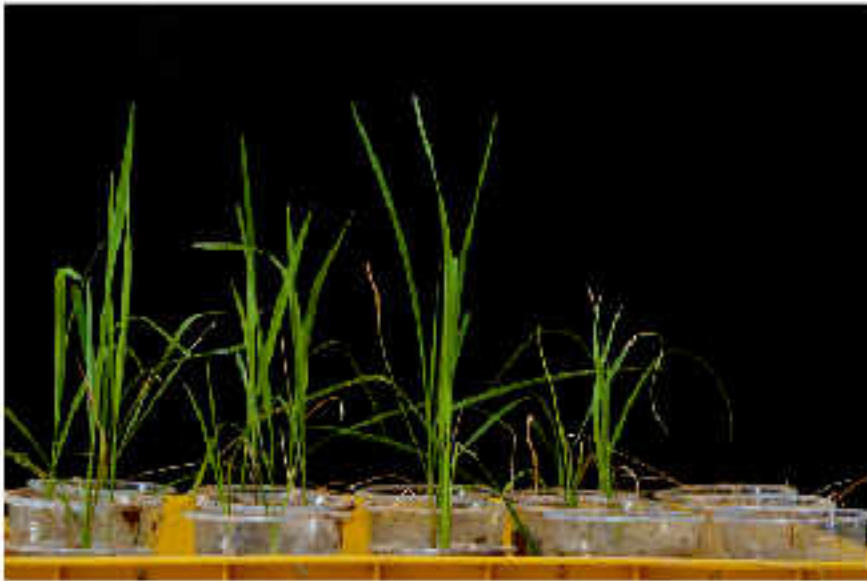
WT L3 L5 U1 U4

# Khả năng giữ nước và phục hồi

Tỷ lệ sống sót sau 02 tuần xử lý hạn cưỡng bức



# Đánh giá khả năng chịu hạn và tạo hạt (T<sub>3</sub>)



20 ngày tuổi: hạn 2 tuần

**WT: 0%**

**T3: 20 – 30%**



20 ngày tuổi: hạn 3 tuần

**WT: 0%**

**T3: L5**

# Đánh giá khả năng chịu hạn và tạo hạt ( $T_3$ )



40 ngày tuổi: hạn 3 tuần

**WT: 0%**

**$T_3$ : 63,33 – 86,67%**

40 ngày tuổi: hạn 5 tuần

**WT: 0%**

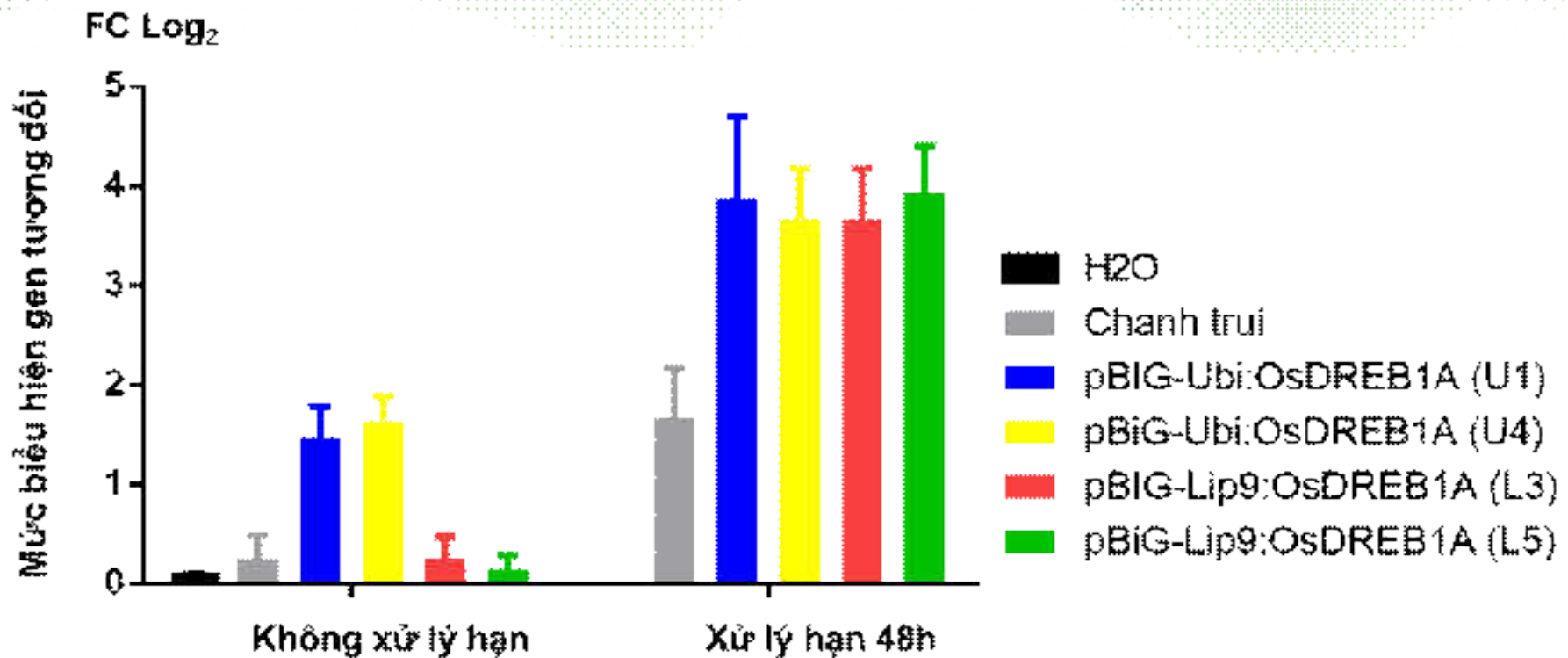
**$T_3$ : 0 - 6,67%**

Các dòng chuyển gen có khả năng phục hồi 20-30%

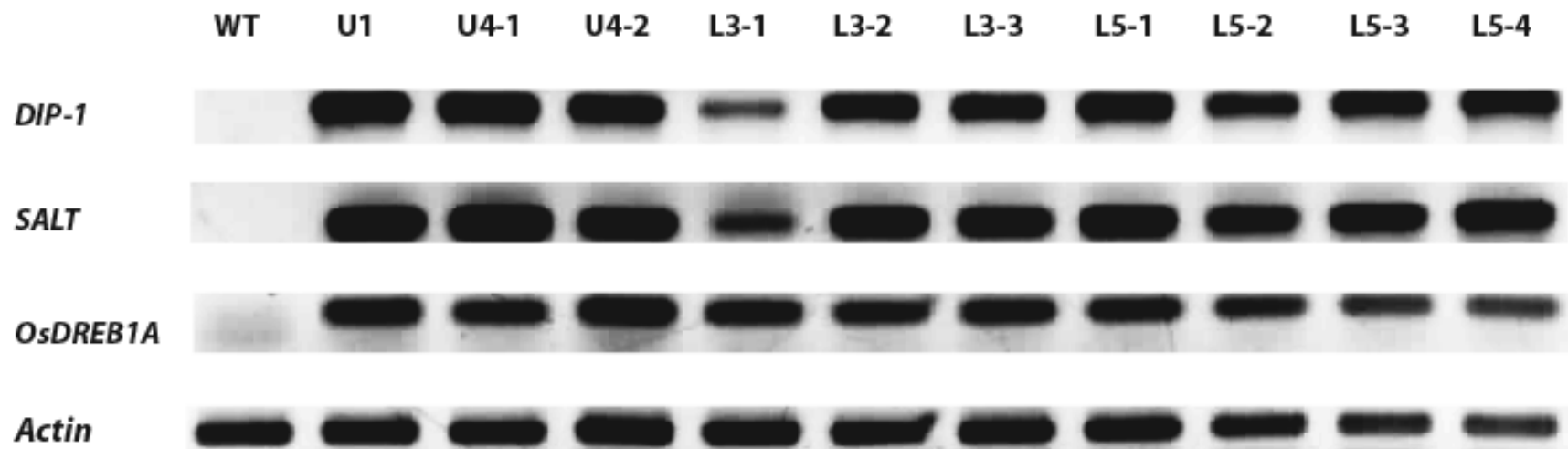
Dòng L5 có khả năng chịu hạn cao nhất.



# *OsDREB1A* tăng cường biểu hiện trong cây chuyển gen khi xử lý hạn



# Đánh giá biểu hiện gen trong cây chuyển gen





**KẾT LUẬN**

**&**

**KIẾN NGHỊ**



# KẾT LUẬN

- ❖ Trình tự mã hóa *OsDREB1A* kích thước 720 bp đã được phân lập thành công và giải trình tự từ DNA tổng số của giống Cườm Dạng 1 và cDNA của giống Mộc Tuyền; trình tự mã hóa *OsDREB2A* kích thước 825 bp đã được phân lập thành công và giải trình tự từ cDNA giống Cườm Dạng 1. Tạo được 04 cấu trúc vector chuyển gen: *Ubi:OsDREB1A*, *Ubi:OsDREB2A*, *Lip9:OsDREB1A* và *Lip9:OsDREB2A* làm vật liệu phục vụ công tác tạo giống cây trồng chịu hạn theo định hướng chuyển gen.
- ❖ Khả năng tạo callus và khả năng tái sinh chồi từ callus của tập đoàn giống lúa trồng ở Việt Nam phụ thuộc chặt chẽ cả hai yếu tố giống và môi trường. Có 05/47 giống lúa (LP-5M, IR80416-B-152-4, YUNLU103-1B, Nếp Khau Để Đòn và Chành Trụi) có tỷ lệ tạo callus lớn hơn 75% trên môi trường MS có bổ sung 2,4D. Có 05/26 giống lúa (LUYIN46, IR80416-B-152-4, LHY-4, YUNLU103-1B và Chành Trụi) có khả năng tái sinh chồi từ callus đạt trên 70% trên môi trường tái sinh TS2 (MS + 2mg/l BAP + 0,5mg/l kinetine). Quy trình chuyển gen cho giống Chành Trụi đã được thiết lập thành công với tỷ lệ **xấp xỉ 15%**.

# KẾT LUẬN

- ❖ Các vector biểu hiện *Ubi:OsDREB1A*, *Ubi:OsDREB2A*, *Lip9:OsDREB1A* và *Lip9:OsDREB2A* đã được chuyển thành công vào giống lúa Chành Trụi. Kết quả sàng lọc trên Hygromycin và kiểm tra cấu trúc chuyển gen với cả môi đặc hiệu gen chuyển và htpIII đã xác định được **51 dòng chuyển** gen độc lập ở thế hệ T<sub>0</sub>.
- ❖ Kết quả sàng lọc kiểu gen và đánh giá kiểu hình đã xác định được **04 dòng** Chành Trụi chuyển gen đồng hợp đã duy trì đến thế hệ T<sub>3</sub> (L3 và L5, cấu trúc *Lip9:OsDREB1A*; U1 và U4, cấu trúc *Ubi:OsDREB1A*) có khả năng phục hồi, kết hạt (tỷ lệ hạt **chắc đạt 13,33 - 20%**) sau 03 tuần ngừng cung cấp nước. Kết quả nghiên cứu biểu hiện (sqRT-PCR và qRT-PCR) cho thấy *OsDREB1A* và gen chỉ thị chịu hạn (*DIP*, *SALT*) ở cây chuyển gen đều được **tăng cường biểu hiện** trong điều kiện hạn và có khác biệt so với cây đối chứng.

# KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu khả năng duy trì tính ổn định ở các thế hệ  $T_3$ ,  $T_4$ ... Của 04 dòng lúa chuyển gen Chanh Trụi đã tạo ra trong nghiên cứu ở các thế hệ tiếp theo (tính bền vững di truyền, khả năng duy trì tính chống chịu, năng suất...).
- Mở rộng nghiên cứu chuyển gen *OsDREB1A* và *OsDREB2A* dưới sự điều khiển của các promoter hoạt động cảm ứng stress vào các đối tượng cây trồng khác để phục vụ công tác chọn tạo giống.

**Xin chân thành cảm ơn!**

