

Nghiên cứu chuyển gen kìm hãm già hóa bộ lá *Atore1*
vào cây mô hình *Arabidopsis thaliana*

Nguyễn Trịnh Hoàng Anh¹, Nguyễn Tiến Dũng^{2*}, Lê Văn Hiền², Ngô Xuân Bình²

¹Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

Study on transferring the gene of leaf delay senescence *Atore1*
into *Arabidopsis thaliana*

Nguyen Trinh Hoang Anh¹, Nguyen Tien Dung^{2*}, La Van Hien², Ngo Xuan Binh²

¹Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

*Corresponding author: dungnt@tuaf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.12.5.2023.003-010>

TÓM TẮT

Nghiên cứu chuyển gen *Atore1* vào cây *Arabidopsis* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và đánh giá biểu hiện của gen trên cây chuyển gen thế hệ T1 và T2. Thế hệ cây chuyển gen T1: đã phân tích sàng lọc bằng PCR 50 cây và xác định được 48 cây mang gen *Atore1*, mức độ biểu hiện gen được phân thành 2 nhóm gồm: (i) nhóm 1 gồm 28 cây, biểu hiện của gen *Atore1* tương đối rõ ràng, lá cây có màu xanh đậm, số lá ra nhiều hơn và cây có thời gian sinh trưởng dài hơn 14 ngày so với đối chứng không chuyển gen. (ii) nhóm 2 gồm 20 cây, gen *Aore1* không có biểu hiện rõ ràng so với đối chứng. Thế hệ cây chuyển gen T2, phân tích và sàng lọc bằng PCR 15 cây, kết quả cho thấy cả 15 cây đều mang gen *Atore1*, đồng thời thế hệ T2 gen *Atore1* biểu hiện tính trạng rõ rệt: cây có lá màu xanh đậm, hàm lượng diệp lục cao hơn so với đối chứng. Điều này cho thấy nhóm nghiên cứu đã thiết kế thành công vector chuyển gen và chuyển gen thành công vào cây *Arabidopsis*, kết quả làm tiền đề cho công tác chuyển gen trên diện rộng ở cây trồng nông nghiệp.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 07/10/2022

Ngày phân biện: 10/11/2022

Ngày quyết định đăng: 30/11/2022

Từ khóa:

Arabidopsis thaliana, chuyển gen, gen *Atore1*, già hóa lá, PCR.

ABSTRACT

Study on transferring *Atore1* gene into *Arabidopsis thaliana* through *Agrobacterium* and evaluating gene expression in T1 and T2 transgenic plants. Generation of transgenic plants T1: analyzed and screened 50 plants by PCR and identified 48 plants carrying *Atore1* gene, gene expression levels were divided into 2 groups as: (i) group 1 includes 28 plants, expression of *Atore1* gene was relatively clear, the leaves were dark green, the number of leaves was higher, and the plant growth period was 14 days longer than that of the non-transgenic control. (ii) group 2 consisted of 20 plants, *Aore1* gene was not expressed clearly compared to the control. Generating T2 transgenic plants, analyzed and screened 15 plants by PCR, the results showed that all 15 plants carry *Atore1* gene, and at the same time, at the T2 generation *Atore1* gene expressed a clear trait: plants with dark green leaves, chlorophyll content was higher than the control. This shows that the research team has successfully designed a transgenic vector and successfully transferred the *Atore1* gene into *Arabidopsis thaliana*. The result is a basis for large-scale gene transfer in agricultural crops.

Keywords:

Arabidopsis thaliana, *Atore1*, gene transfer, leaf senescence, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bộ lá có vai trò quan trọng đối với sinh trưởng và năng suất của cây trồng, mục tiêu của các nhà chọn giống thường chọn giống với bộ lá có tuổi thọ phù hợp, khỏe để đảm bảo cây

cho năng suất cao ổn định [1]. Các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, quá trình già hóa và ngược lại là quá trình kìm hãm làm chậm sự già hóa của bộ lá là các yếu tố di truyền được kiểm soát bằng nhiều gen khác nhau [2-4].

Oh và cộng sự đã phân lập được 5 gen (được đặt tên là *ore1*, *ore2*, *ore3*, *ore9* và *ore11* có khả năng kiểm soát làm chậm quá trình già hóa của bộ lá [5]. Gen kim hãm quá trình già hóa của bộ lá được ứng dụng nhiều trong quá trình chọn tạo giống, các nhà chọn tạo giống tìm cách tích hợp các gen nêu trên vào các cây trồng nhằm kéo dài tuổi thọ của bộ lá với nhiều phương pháp khác nhau như chuyển gen, chỉnh sửa gen, lai tạo... *ORE1* thuộc nhóm yếu tố phiên mã NAC liên quan đến quá trình già hóa của các tế bào lá, đồng thời tăng cường khả năng chống chịu điều kiện bất lợi như hạn, mặn. Gen *AtORE1* nằm trên nhiễm sắc thể số 5 (At5g39610), kích thước 1514 bp, có 3 exon và 2 intron, kích thước vùng gen mã hóa (cDNA) có chiều dài 855 bp (TAIR, <https://seqviewer.arabidopsis.org>). Gen *Atore1* có chiều dài 1119 bp được tách từ cây *Arabidopsis* đột biến tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Để đánh giá khả năng biểu hiện của gen, nghiên cứu đã chuyển vào cây *Arabidopsis thaliana*. Nội dung của nghiên cứu trình bày kết quả "Nghiên cứu chuyển gen kim hãm già hóa của bộ lá *Atore1* vào cây mô hình *Arabidopsis thaliana*". Kết quả nghiên cứu làm cơ sở khoa học phục vụ cho việc chuyển gen ở cây trồng nông nghiệp nhằm nâng cao năng suất và chất lượng nông sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu gồm: cây *A. thaliana*, vector chuyển gen pER8 mang gen kim hãm quá trình già hóa lá *Atore1* được thiết kế bởi Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, chủng vi khuẩn GV3101 do Trường Đại học DongA, Hàn Quốc cung cấp. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Khoa CNSH-CNTP, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị cây để biến nạp gen

Hạt giống cây *A. thaliana* loại Columbia (Col) được gieo nảy mầm trên giá thể đất. Cây con nảy mầm sau 5 ngày được chuyển ra trồng trên chậu có kích thước 5 x 7 cm nuôi ở điều kiện nhiệt độ 22°C cho đến khi cây ra hoa.

2.2.2. Chuẩn bị vi khuẩn biến nạp

Trước khi biến nạp 1 ngày, chủng vi khuẩn GV3101 mang vector chuyển gen kim hãm già hóa lá *Atore1* được nuôi trên môi trường YEP lỏng (5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, và 10 g/L peptone) có kháng sinh chọn lọc Rifampicin (250 mg/l) và Kanamycin (50 mg/l). Chủng vi khuẩn được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 28°C. Mật độ vi khuẩn được kiểm tra bằng máy nanodrop ở bước sóng OD600. Khi giá trị mật độ quang OD600 đạt 0,8-1,0 tiến hành ly tâm dịch khuẩn để thu tế bào. Tế bào vi khuẩn được hòa loãng bằng môi trường 1/2MS lỏng để biến nạp.

2.2.3. Biến nạp gen vào cây *Arabidopsis*

Chuyển gen *Atore1* vào cây *Arabidopsis* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* theo phương pháp của Clough (1998) [6]. Cây *Arabidopsis* (Col) 15 ngày tuổi được cắt bỏ chồi chính để kích thích các chồi bên phát triển. Chọn cây khỏe, nhiều nụ hoa để tiến hành lây nhiễm với vi khuẩn *A. tumefaciens*. Nhúng chùm hoa vào dung dịch vi khuẩn đã chuẩn bị sẵn. Mẫu lây nhiễm được nuôi ở chế độ chiếu sáng 16 h/ngày, nhiệt độ 22°C cho tới khi thu hoạch quả. Quá trình chuyển gen được thực hiện 2 lần, mỗi lần 6 cây.

2.2.4. Chọn lọc cây chuyển gen *T1* mang gen *Atore1*

Hạt sau khi thu hoạch được khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 10 phút, sau đó được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có kháng sinh, gồm: môi trường 1/2MS + 50 mg/l Kanamycin, nuôi cây ở nhiệt độ phòng 22°C, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Sau 10 ngày tiến hành đánh giá tỷ lệ cây chuyển gen (mang gen *Atore1*).

Tỷ lệ cây chuyển gen (%) = Số cây kháng kanamycin/Tổng số hạt gieo trên môi trường x 100%

2.2.5. Đánh giá cây chuyển gen ở thế hệ *T1* và *T2*

Cây chuyển gen ở thế hệ *T1* và *T2* được đánh giá thông qua hình thái bộ lá và phân tích PCR để đánh giá sự hiện diện của gen *Atore1* trên cây chuyển gen sử dụng cặp mồi

Atore1-F (5'-GCGGCCGCATGGATTACGAGGCATCAA
G-3') và *Atore1*-R (5'-

ACTAGTTCAGAAATTCCAAACGCAATC C-3') do hãng SolGenet cung cấp. DNA tổng số được tách từ mẫu lá theo phương pháp của Kasajima và cộng sự [7].

Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 20 µl gồm: 15 µl PCR mastermix, 1µl mỗi mỗi (10 pmol) , 1µl DNA khuôn (20 ng) và 2µl dH₂O, tiến hành ở 35 chu kỳ gồm 94°C/30 s;

55°C/45 s; 72°C/40 s trên máy PCR mastercycler nexus (Eppendorf). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, sử dụng thang DNA maker 1 kb hãng Thermofisher.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chuyển gen *Atore1* vào cây *Arabidopsis*

Bảng 1. Kết quả chuyển gen *Atore1* vào cây *Arabidopsis* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

| Thí nghiệm | Số cây biến nạp | Số cây thu hạt |
|------------------|-----------------|----------------|
| TN1 | 6 | 6 |
| TN2 | 6 | 6 |
| Tổng cộng | 12 | 12 |

Kết quả chuyển gen sau 2 lần biến nạp đã thu được tổng số 12 cây (Bảng 1) mang các chùy hoa được biến nạp gen, sau đó cây được nuôi trồng trong điều kiện phòng thí nghiệm để thu hạt làm vật liệu cho chọn lọc và đánh giá tiếp theo.

3.2. Chọn lọc cây chuyển gen T1 mang gen *Atore1*

Để chọn lọc cây chuyển gen, hạt T1 thu từ cây T0 được gieo nảy mầm trên môi trường 1/2MS bổ sung kháng sinh chọn lọc Kanamycin nồng độ 50 mg/l, nuôi ở 22°C, 16 h chiếu sáng. Sau 10 ngày tiến hành đánh giá hiệu quả chuyển gen thông qua tỷ lệ cây kháng và không kháng Kanamycin. Kết quả thu được ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chọn lọc cây *Arabidopsis* chuyển gen *Atore1*

| Thí nghiệm | Số hạt chọn lọc | Số cây kháng Kanamycin | Số cây chết | Tỷ lệ cây kháng Kanamycin |
|------------------|-----------------|------------------------|-------------|---------------------------|
| TN1 | 500 | 116 | 384 | 23,2 |
| TN2 | 500 | 151 | 349 | 30,2 |
| Tổng cộng | 1000 | 267 | 733 | 26,75 |

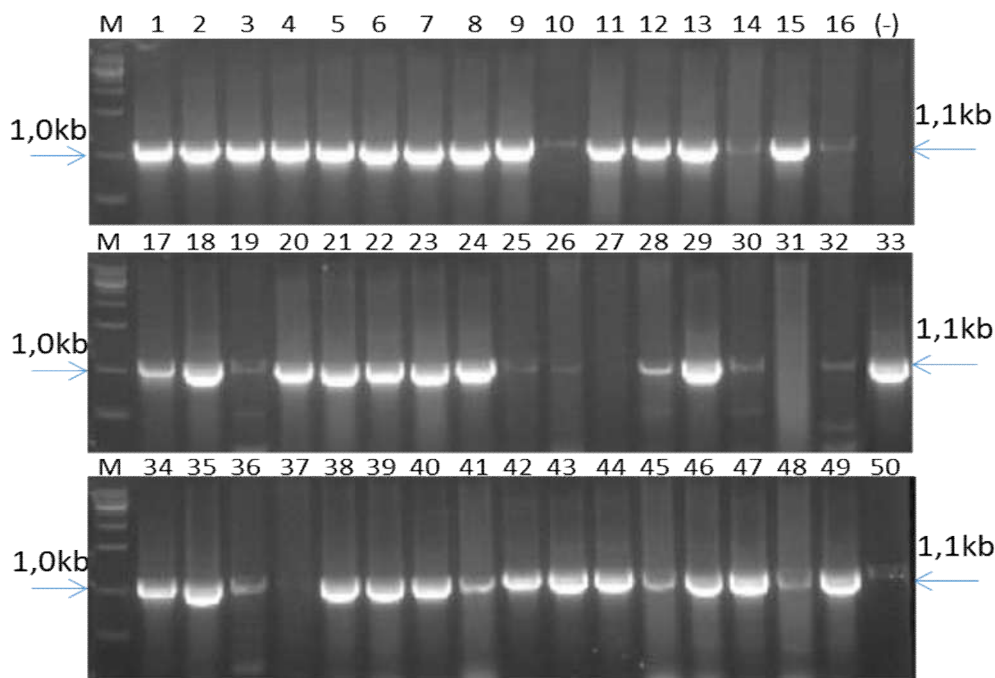
Cây chuyển gen nếu mang gen kháng Kanamycin có khả năng sống sót trên môi trường có loại kháng sinh này với nồng độ thường dùng khoảng từ 50 – 70 mg Kanamycin/l. Gen *Atore1* cùng với gen kháng Kanamycin cùng nằm trong vùng giới hạn trái (LB) và giới hạn phải (RB). Vì vậy cây sống sót và sinh trưởng bình thường trên môi trường kháng sinh có khả năng sẽ là các cây mang gen chuyển *Atore1*.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy trong tổng số 1000 hạt T1 được chọn lọc trên môi trường bổ sung 50 mg/l Kanamycin, thu được 267 cây sống sót và 733 cây chết. Kết quả này cho thấy hiệu quả chọn lọc cây chuyển gen tương đối cao (26,75%). Các kháng kanamycin tiếp tục được trồng và kiểm tra sự có mặt của gen đích *Atore1*.

3.3. Đánh giá cây chuyển gen *Atore1* bằng PCR ở thế hệ T1

Trong tổng số 267 cây kháng kanamycin, nhóm nghiên cứu lựa chọn 50 cây để tiến hành sàng lọc bằng PCR. Cây thí nghiệm được trồng riêng rẽ trong điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ 22°C, 16 h chiếu sáng/ngày, ký hiệu D1-D50). Khi cây bước sang giai đoạn ra hoa, tiến hành lấy mẫu lá kiểm tra sự có mặt của gen *Atore1* bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Kết quả phân tích PCR cho thấy trong tổng số 50 cây kiểm tra có 48 cây dương tính với gen *Atore1*, trên bản gel điện di xuất hiện băng DNA với kích thước tương ứng khoảng 1,1 kb, có 02 mẫu không cho sản phẩm có kích thước tương ứng với gen *Atore1* (mẫu số 27 và 37, Hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Atore1* ở cây chuyển gen thế hệ T1

M: DNA marker, từ 1-50: thứ tự cây chuyển gen, (-) cây không chuyển gen (đối chứng)

Kết quả phân tích PCR cho thấy các mẫu dương tính là cây chuyển gen mang gen chuyển *Atore1*. Ngược lại, các mẫu âm tính là cây không mang gen *Atore1* (Hình 1), từ phân

tích PCR nhóm nghiên cứu thu được 48 cây mang gen đích *Atore1*.

3.4. Đánh giá biểu hiện gen thông qua hình thái của cây chuyển gen thế hệ T1

Bảng 3. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng ở cây chuyển gen *Atore1* thế hệ T1

| Phân nhóm | Đặc điểm bộ lá | | | Thời gian sinh trưởng (ngày) |
|-----------|----------------|----------|-----------|------------------------------|
| | Số lá (lá) | Dài (cm) | Rộng (cm) | |
| Nhóm 1 | 23,1 | 1,6 | 0,7 | 46,0 |
| Nhóm 2 | 16,4 | 2,2 | 1,1 | 32,5 |
| Đối chứng | 17,0 | 2,3 | 1,2 | 32,0 |

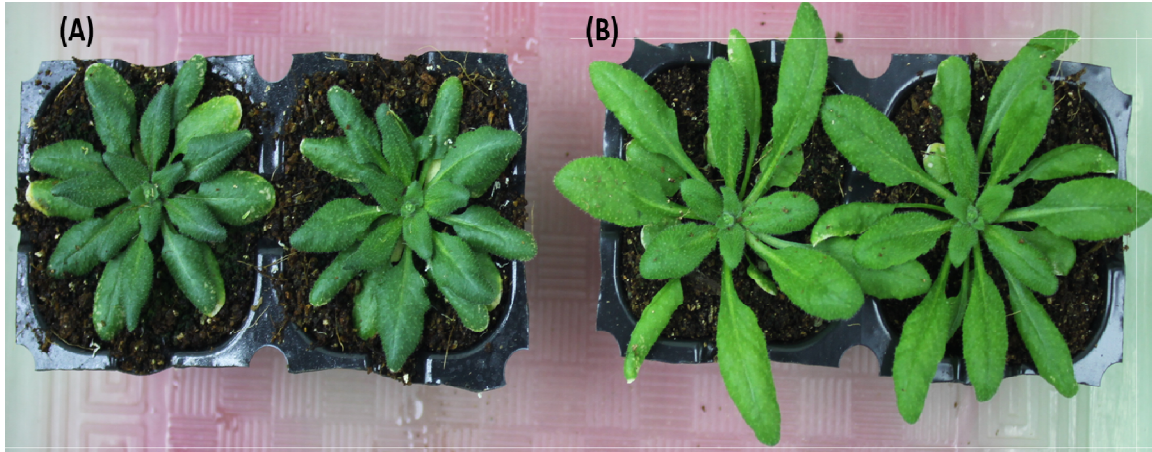
Ghi chú: Nhóm cây được phân theo đặc điểm sinh trưởng và hình thái gồm: Nhóm 1: lá màu xanh đậm; Nhóm 2: lá màu xanh nhạt.

Từ kết quả PCR, 48 cây mang gen *Atore1* được đánh giá đặc điểm hình thái, sinh trưởng liên quan đến biểu hiện của gen *Atore1*, kết quả được thể hiện ở Bảng 3 và Hình 2. Trong tổng số 48 cây chuyển gen T1 được chia làm 2 nhóm khác nhau. Nhóm 1 có 28 cây cho hình thái khác biệt so với đối chứng không chuyển gen (cây đối chứng - wt). Các cây này có số lượng lá nhiều hơn, trung bình đạt 23,1 lá/cây, so với đối chứng chỉ có 17 lá/cây. Đồng thời nhóm 1 cũng có kích thước lá nhỏ hơn so với đối chứng (Bảng 3), tuy nhóm 1 có bộ lá dày

hơn, màu xanh đậm hơn so với đối chứng chỉ ở màu xanh nhạt. Nhóm 2 gồm 20 cây còn lại có lá màu xanh nhạt tương đương màu xanh của cây đối chứng, số lá đạt 16,4 lá/cây, chiều dài và rộng lá lần lượt đạt là 2,2 cm và 1,1 cm, các chỉ số sinh trưởng tương đương và không có sự khác biệt so với đối chứng. Đặc biệt, thời gian sinh trưởng, cây nhóm 1 có thời gian sinh trưởng dài hơn so với đối chứng 14 ngày, trong khi nhóm 2 có thời gian sinh trưởng tương đương so với đối chứng (32,5 ngày). Từ kết quả trên cho thấy, trong số cây được xác định

mang gen đích (*Atore1*), biểu hiện của gen chỉ thể hiện rõ ràng ở nhóm 1, có thời gian sinh trưởng dài hơn, lá màu xanh đậm hơn, so với đối chứng. Đồng thời gen *Atore1* gần như không

có biểu hiện hoặc biểu hiện không rõ ràng ở cây chuyển gen nhóm 2. Từ kết quả này nhóm nghiên cứu tiếp tục sử dụng cây nhóm 1 làm vật liệu chọn lọc đánh giá ở các thế hệ tiếp theo.



Hình 2. Hình thái lá của cây *Arabidopsis* chuyển gen *Atore1* thế hệ T1

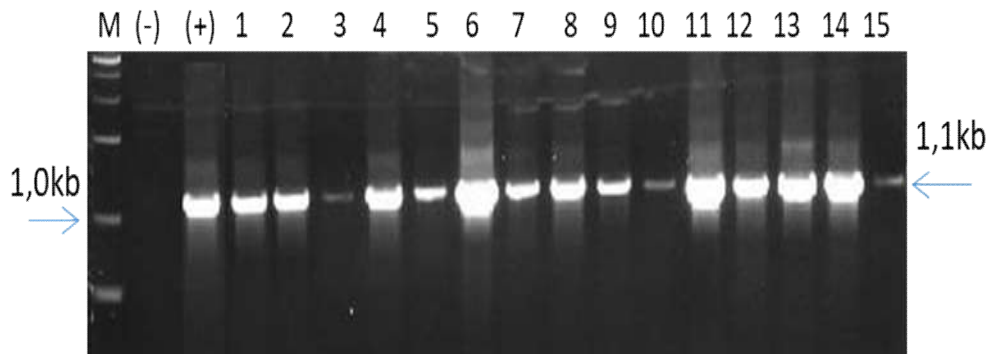
A. Cây chuyển gen *Atore1*, lá xanh đậm, lá dày hơn so với đối chứng;

B. Cây đối chứng không chuyển gen, lá màu xanh nhạt, thời gian sinh trưởng ngắn hơn cây chuyển gen

3.5. Đánh giá cây chuyển gen *Atore1* bằng PCR ở thế hệ T2

Dựa trên kết quả phân tích PCR và hình thái ở thế hệ T1, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá 5 dòng mang gen *Atore1* (thuộc nhóm 1,

Bảng 4) ở thế hệ T2. Kết quả phân tích PCR cho thấy tất cả 15 dòng T2 chuyển gen này đều cho kết quả dương tính với gen *Atore1* (Hình 3). Điều này chứng tỏ các gen chuyển *Atore1* đã được di truyền sang thế hệ sau (T2).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Atore1* ở cây chuyển gen thế hệ T2

M-DNA marker, (-) đối chứng âm (cây không chuyển gen) và (+) đối chứng dương (DNA plasmid), từ 1-15 là thứ tự các mẫu kiểm tra

3.6. Đánh giá biểu hiện gen thông qua hình thái lá ở cây chuyển gen thế hệ T2

Kết quả đánh giá hình thái các cây chuyển gen T2 cho thấy cây có lá màu xanh đậm hơn so với cây đối chứng không chuyển gen (wt).

Số lượng lá dao động từ 21 đến 24 lá/cây, giá trị trung bình đạt 22,3 lá/cây cao hơn đối chứng không chuyển gen chỉ đạt 16 lá/cây, tuy nhiên kích thước lá nhỏ hơn so với cây đối chứng (Bảng 4).

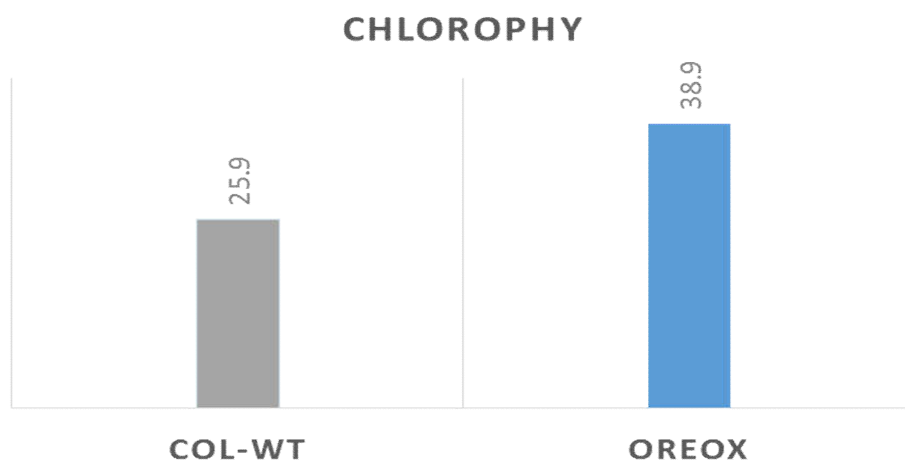
Bảng 4. Hình thái lá của cây chuyển gen *Atore1* thế hệ T2

| STT | Ký hiệu | | Số lượng lá | Màu sắc lá | Kích thước lá (cm) | |
|-----------|---------|-------|-------------|------------|--------------------|------------|
| | T1 | T2 | | | Dài | Rộng |
| 1 | | D3-1 | 22 | Xanh đậm | 1,2 | 0,9 |
| 2 | D1-5 | D3-2 | 21 | Xanh đậm | 1,7 | 0,7 |
| 3 | | D3-3 | 23 | Xanh đậm | 1,5 | 0,8 |
| 4 | | D3-4 | 22 | Xanh đậm | 1,8 | 0,7 |
| 5 | D1-10 | D3-5 | 22 | Xanh đậm | 1,3 | 0,8 |
| 6 | | D3-6 | 21 | Xanh đậm | 1,6 | 0,8 |
| 7 | | D3-7 | 24 | Xanh đậm | 1,8 | 0,9 |
| 8 | D1-12 | D3-8 | 23 | Xanh đậm | 1,8 | 1,0 |
| 9 | | D3-9 | 24 | Xanh đậm | 1,4 | 0,8 |
| 10 | | D3-10 | 22 | Xanh đậm | 1,7 | 0,8 |
| 11 | D1-16 | D3-11 | 23 | Xanh đậm | 1,7 | 1,1 |
| 12 | | D3-12 | 21 | Xanh đậm | 1,4 | 0,7 |
| 13 | | D3-13 | 22 | Xanh đậm | 1,7 | 0,9 |
| 14 | D1-30 | D3-14 | 22 | Xanh đậm | 1,2 | 0,4 |
| 15 | | D3-15 | 23 | Xanh đậm | 1,4 | 0,7 |
| 16 | | Wt | 16 | Xanh nhạt | 2,01 | 0,8 |
| TB | | | 22,3 | | 1,6 | 0,8 |

Kiểm tra hàm lượng chlorophyll trong lá của các cây chuyển gen T2, kết quả phân tích cho thấy hàm lượng chlorophyll trong lá cây chuyển gen T2 cao hơn nhiều so với cây đối chứng không chuyển gen (Hình 4). Kết quả này khẳng định cây chuyển gen *Atore1* đã gia tăng hàm lượng chlorophyll trong lá dẫn đến hình thái lá có màu xanh đậm.

Kết quả theo dõi độ bền của lá (khả năng duy trì màu xanh) thông qua việc duy trì hàm

lượng chlorophyll - yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sức sống, tuổi thọ, độ bền của lá trên cây cho thấy cây chuyển gen *Atore1* có khả năng duy trì lá xanh trên cây ngay cả ở giai đoạn chuẩn bị quả chín (45-50 sau ngày trồng), trong khi đó cây không chuyển gen bộ lá chỉ tồn tại được trong khoảng 30-35 ngày, vì thế cây chuyển gen có thời gian sinh trưởng kéo dài hơn so với đối chứng từ khoảng 14 - 20 ngày.



Hình 4. Biểu đồ so sánh hàm lượng diệp lục (chlorophyll) giữa cây chuyển gen *Atore1* (OREOX) và cây đối chứng không chuyển gen (Col-wt) ở giai đoạn thu hoạch

Ở mức độ phân tử các nhà khoa học đã chứng minh rằng già hóa lá là một quá trình phức tạp, không đơn thuần là sự phân hủy cấu trúc tế bào, sự điều chuyển các thành phần dinh dưỡng sang các bộ phận khác mà nó phụ thuộc vào thành phần tế bào và các gen biểu hiện [5, 8]. Đặc biệt, khi bước vào giai đoạn già hóa lượng RNA tổng số giảm mạnh do nhiều gen không còn hoạt động ở giai đoạn này [9]. Nghiên cứu hệ gen phiên mã cho thấy có rất nhiều gen tham gia vào quá trình già hóa lá. Trong đó hai yếu tố phiên mã chính là NAC và WRKY được chứng minh có vai trò chính điều khiển quá trình này [4, 10]. Cho tới nay có khoảng 30 gen NAC có chức năng kéo dài tuổi thọ được nghiên cứu [11-14]. ORESARA1 (*ORE1*) là một yếu tố phiên mã thuộc nhóm NAC có tham gia vào quá trình già hóa bộ lá được chứng minh bởi Balazadeh và cộng sự (2010) [15]. *ORE1* kiểm soát sự biểu hiện của 170 gen khác trong đó có 78 gen (*SAGs*) tham gia già hóa đã biết, trong đó có gen phân hủy các acid nucleic BFN1. Rauf và cộng sự (2013) nghiên cứu tương tác protein *ORE1* đã khẳng định vai trò của *ORE1* trong con đường kiểm soát già hóa. Các tác giả chỉ ra rằng gen *ORE1* tương tác với yếu tố phiên mã G2 (*GLK1* và *GLK2*) duy trì và phát triển tế bào lục lá [3]. Ở giai đoạn đầu khi lá mới hình thành gen *GLKs* biểu hiện rất mạnh, tuy nhiên khi lá già sự biểu hiện của gen *ORE1* tăng và kìm hãm các hoạt động phiên mã của gen *GLKs*. Sự xuất hiện của gen *ORE1* đã kiểm soát quá trình già hóa thông qua kích hoạt các gen *SAGs* và thay đổi các hoạt động phiên mã thông qua tương tác giữa protein. Kết quả theo dõi các cây chuyển gen *Atore1* cho thấy lá có hàm lượng diệp lục tăng và thời gian sinh trưởng kéo dài hơn so với đối chứng. Điều này có thể là do tác động của gen chuyển, tuy nhiên cần tiến hành các phân tích sâu hơn ở mức độ phiên mã của gen ở các thế hệ tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chuyển thành công gen *Atore1* vào cây *Arabidopsis* và chọn lọc được 267 cây chuyển gen T₁ mang gen. Đánh giá 50

cây chuyển gen thông qua đặc điểm hình thái và PCR cho thấy 48 cây mang gen *Atore1* có biểu hiện hình thái lá khác nhau và được phân thành 2 nhóm gồm: (i) nhóm 1 gồm 28 cây, biểu hiện của gen *Atore1* tương đối rõ ràng, lá cây có màu xanh đậm, số lá ra nhiều hơn và thời gian sinh trưởng dài hơn 14 ngày so với đối chứng không chuyển gen; (ii) nhóm 2 gồm 20 cây, gen *Atore1* không có biểu hiện rõ ràng so với đối chứng. Thế hệ T2 gen *Atore1* biểu hiện tính trạng rõ rệt: cây có lá màu xanh đậm, hàm lượng diệp lục cao hơn so với đối chứng. Kết quả này làm tiền đề cho công tác chuyển gen ở cây trồng nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Grant J.J., Yun B.W. & Loake G.J. (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J.* 24(5):569-582. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00902.x.
- [2]. Guo Y. & Gan S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* 46: 601-612. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02723.x. PMID: 16640597.
- [3]. Rauf M., Arif M., Dortay H., Matallana-Ramírez L.P., Waters M.T., Nam H.G., Lim P.O., Mueller-Roeber B. & Balazadeh S. (2013). ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Rep.* 14: 382-388. doi: 10.1038/embor.2013.24.
- [4]. Woo H.R., Kim H.J., Nam H.G. & Lim P.O. (2013). Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *J. Cell. Sci.* 126: 4823-4833. doi: 10.1242/jcs.109116.
- [5]. Oh S.A., Park J.H., Lee G.I., Paek K.H., Park S.K. & Nam H.G. (1997). Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 12: 527-535. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.00527.x.
- [6]. Clough S. J. & Bent A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
- [7]. Kasajima I., Ide Y., Ohkama-Ohtsu N., Yoneyama T. & Fujiwara T. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22: 49-52. doi: 10.1186/1746-4811-6-1.
- [8]. Nam H.G. (1997). The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology.* 8: 200-207. doi: 10.1016/s0958-1669(97)80103-6.

- [9]. Lohman K.N., Gan S., John M.C. & Amasino R.M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. 92: 322-328. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb05343.x
- [10]. Woo H.R., Koo H.J., Kim J., Jeong H., Yang J.O., Lee I.H. (2016). Programming of plant leaf senescence with temporal and inter-organellar coordination of transcriptome in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 171: 452-467. doi: 10.1104/pp.15.01929.
- [11]. Oda-Yamamizo C., Mitsuda N., Sakamoto S., Ogawa D., Ohme-Takagi M. & Ohmiya A. (2016). The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in *Arabidopsis* leaves. *Sci. Rep.* 6: 23609. doi: 10.1038/srep23609.
- [12]. Breeze E., Harrison E., Mchattie S., Hughes L., Hickman R. & Hill C. (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell*. 23: 873-894. doi.org/10.1105/tpc.111.083345
- [13]. Kim H.J., Nam H.G. & Lim P.O. (2016). Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol*. 33: 48-56. doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.002.
- [14]. Kan C., Zhang Y., Wang H.L, Shen Y., Xia X., Guo H. & Li Z. (2021). Transcription Factor NAC075 Delays Leaf Senescence by Deterring Reactive Oxygen Species Accumulation in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 12: 634040. doi: 10.3389/fpls.2021.634040.
- [15]. Balazadeh S., Siddiqui H., Allu A.D., Matallana-Ramirez L.P., Caldana C. & Mehrnia M. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J*. 62: 250-264. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04151.x.