

GEN *Eg707*, MỘT ĐÁNH DẤU PHÂN TỬ TRIỂN VỌNG ĐỂ KIỂM TRA SỰ HÌNH THÀNH PHÔI VÔ TÍNH TRÊN CÂY CỌ DẦU

Lê Vĩnh Thúc¹, Huỳnh Kỳ², Nguyễn Phước Đăng² và Parameswari Namasivayam³

ABSTRACT

In this study, the molecular characterization of clone Eg707 isolated from cell suspension culture of the oil palm was reported. Southern analysis result showed that Eg707 might be present as a single copy gene in the oil palm genome. This gene is highly expressed in tissue cultured materials compared to vegetative and reproductive tissues, suggesting a role of this gene during oil palm somatic embryogenesis or at the early stages of embryo development. Expression analysis of Eg707 by RNA in situ hybridization showed that Eg707 transcripts were present throughout somatic embryo development starting from proembryo formation at the embryogenic callus stages till the maturing embryo stages. Since proembryo formation within the embryogenic callus is one of the first key factors in oil palm somatic embryo development, it is suggested that Eg707 could be used as a reliable molecular marker for detecting early-stage of oil palm somatic embryogenesis.

Keywords: oil palm, novel transcript, Eg707, molecular marker, somatic embryogenesis

Title: Gene Eg707, a potential molecular marker to detect somatic embryo formation in oil palm

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, gen *Eg707* được phân lập từ tế bào nuôi cấy treo đã được khảo sát đặc tính phân tử. Kết quả phân tích Southern cho thấy *Eg707* có thể là đơn gen trong bộ gen của cây cọ dầu. Gen *Eg707* biểu hiện gen rất cao ở tế bào của mô được nuôi cấy hơn là ở những tế bào sinh dưỡng, điều đó chứng tỏ *Eg707* có thể đóng góp trong quá trình hình thành phôi vô tính hay là trong giai đoạn đầu của quá trình phát triển phôi. Kỹ thuật lai RNA in situ một lần nữa chứng minh gen *Eg707* được biểu hiện trong suốt giai đoạn phát triển phôi, sự biểu hiện gen bắt đầu từ sự hình thành phôi, từ giai đoạn callus đến giai đoạn phôi trưởng thành. Bởi vì sự hình thành mầm phôi trong thời kỳ callus phát sinh phôi là một trong những nhân tố chính cho sự phát triển phôi vô tính của cây cọ dầu, nên *Eg707* có thể được đề nghị như là một đánh dấu phân tử để kiểm tra sự hình thành phôi vô tính ở giai đoạn đầu của cây cọ dầu.

Từ khóa: cọ dầu, phiên bản mới, *Eg707*, đánh dấu phân tử, phôi vô tính

1 GIỚI THIỆU

Cọ dầu (*Elaeis guineensis* Jacq.) là cây một lá mầm có giá trị kinh tế quan trọng vì là cây cung cấp dầu ăn lớn nhất trên thế giới (Ahmad *et al.*, 2008). Cây cọ dầu có sản lượng dầu cao nhất trên một hecta so với tất cả các loại cây có dầu (Gorret *et al.*, 2004) và năng suất dầu trung bình cho một hecta có thể lên đến 4.08 tấn. Tuy

¹Bộ môn Khoa Học Cây Trồng, Khoa Nông Nghiệp và SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

²Bộ môn Di Truyền Giống Nông Nghiệp, Khoa Nông Nghiệp và SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

³Cell and Molecular Biology Department, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400, UPM, Serdang, Selangor, Malaysia

nhiên, trong xu hướng phát triển công nghiệp dầu cọ ở thế kỷ 21 gặp phải những thách thức làm thế nào để duy trì ở thế cạnh tranh và lợi nhuận của cây cọ dầu trong điều kiện lao động ít và đất đai bị giới hạn (Parveez *et al.*, 2000). Thêm vào đó, nhu cầu dầu cọ thì gia tăng trong tương lai cùng với sự gia tăng dân số. Do đó, để đáp ứng được nhu cầu dầu cọ của thế giới, việc cải thiện năng suất cũng như chất lượng dầu cọ trong thời gian ngắn là vấn đề cần làm (Sambanthamurthi *et al.*, 2009). Tuy nhiên, việc cải thiện giống bằng con đường lai tạo theo phương pháp cổ điển thì rất lâu vì một chu kỳ phóng thích ra được một giống cọ dầu mang đặc tính mong muốn cũng mất gần 10 năm. Chiến lược cải thiện giống bằng lai tạo sẽ tốn nhiều công lao động và mất thời gian vì chu kỳ phát triển của cây dài và không có nhân giống tự nhiên được bằng vô tính và tính hỗn tạp trong lai tạo cao (Staritsky, 1970; Jouannic *et al.*, 2005). Hơn thế nữa, những giống cọ dầu trồng hiện tại lại có nguồn gốc từ một nguồn gen hẹp, điều đó rất khó cho những người chọn giống tạo giống mới trong điều kiện nguồn gen bị giới hạn (Parveez *et al.*, 2000). Do đó, ngành công nghệ dầu cọ tìm ra một phương pháp mới để nhân nhanh những cây bố mẹ có đặc tính tốt cho việc sản xuất hạt và những dòng tốt làm cây con để cung cấp cho thị trường (Basri *et al.*, 2005).

Nhân những dòng tốt bằng phương pháp nhân giống vô tính của cây cọ dầu được nghiên cứu từ nhiều năm qua và là phương pháp triển vọng để cải thiện năng suất cây cọ dầu (Gorret *et al.*, 2004). Theo Willis *et al.* (2008), những vườn cọ dầu được trồng từ những cây có đặc tính tốt từ nuôi cấy mô cho năng suất tăng lên khoảng 30% và rút ngắn thời gian cho trái. Ưu thế của phương pháp nhân giống bằng con đường nuôi cấy mô thì cho những cây con đồng nhất mang những đặc tính tốt ví dụ như cho năng suất cao, kháng sâu bệnh. Để nhân nhanh giống cọ dầu bằng phương pháp nhân giống vô tính, nuôi cấy tế bào treo (giai đoạn hình thành phôi) được nghiên cứu và tận dụng trong những thập niên qua (Gorret *et al.*, 2004; Tarmizi *et al.*, 2004). Tuy nhiên, việc hình thành callus từ vật liệu nuôi cấy thì rất thấp, khoảng 19% (Corley và Tinker, 2003), trong khi tỉ lệ trung bình của việc hình thành phôi từ những callus sinh sôi chỉ đạt cao nhất là 6% (Wooi, 1995). Theo Willis *et al.* (2008) cho rằng nhân giống vô tính bằng con đường nuôi cấy mô cho cây cọ dầu tốn nhiều thời gian và công lao động trong giai đoạn phòng thí nghiệm. Vì thế, quá trình nhân giống bằng nuôi cấy mô của cây cọ dầu cần phải cải thiện. Để loại bỏ những trở ngại trên, đánh dấu phân tử cho quá trình hình thành phôi được nghiên cứu ở mức độ phân tử cho việc phát hiện những mô tốt, phát hiện quá trình hình thành callus và phôi, để việc nhân giống vô tính của cây với một lượng lớn (Low *et al.*, 2006). Sự phát hiện sớm khả năng tạo callus và hình thành phôi vô tính có thể giúp giảm chi phí và thời gian trong tiến trình nuôi cấy mô cây cọ dầu. Về khía cạnh này, số lượng lớn thư viện cDNA của cây cọ dầu đã được thành lập (Jouannic *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Low *et al.*, 2008) thì rất hữu ích cho việc xác định gen, sự biểu hiện gen, tìm ra được đầy đủ đoạn cDNA (Boonanuntanasarn, 2008), tìm ra những đánh dấu phân tử (Rudd, 2003). Tuy nhiên, có rất nhiều gen mới hiện diện rất lớn trong thư viện những đoạn gen được biểu hiện (EST). Thí dụ như, Low *et al.* (2008) ước tính có 45,5% trong số 17.599 EST từ 12 thư viện cDNA là protein mới. Thêm vào đó, những EST có thể rất quan trọng trong việc tìm ra những chu trình của các phản ứng sinh hóa hay quá trình điều khiển sự phát triển của cây (Fristensky *et al.*, 1999). Vì thế, mục đích

của nghiên cứu này là khảo sát đặc tính phân tử của gene *Eg707* từ EST của tế bào nuôi cấy treo của cây cọ dầu. Đây là một kết quả sơ khởi cho thấy gen *Eg707* biểu hiện rất cao ở giai đoạn nuôi cấy tế bào treo, có thể nó có sự ảnh hưởng rất quan trọng trong quá trình nuôi cấy mô của cây cọ dầu.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Đoạn biểu hiện gen (Expressed sequence tag, EST) dòng *Eg707* được phân lập trước đó từ tế bào nuôi cấy treo của cây cọ dầu (Ooi, 2003) và được đưa lên ngân hàng gen (Acc. No. FJ196136). Lá non, mô phân sinh, rễ, hoa cái, tế bào nuôi cấy treo, callus không tạo phôi, callus tạo phôi vô tính, phôi hữu tính của cây cọ dầu và EST dòng được cung cấp bởi viện nghiên cứu dầu cọ Malaysia (MPOB).

2.2 Phân tích chuỗi trình tự

Phân tích chuỗi trình tự được thực hiện sử dụng dụng cụ Basic Local Alignment Search Tool 2.0 (BLAST 2.0) (Altschul *et al.*, 1997). Dự đoán dấu hiệu giàu leucine nhân của chuỗi polypeptide *Eg707* được thực hiện dựa trên chương trình NetNES 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>). Dự đoán khối lượng phân tử (MW) và điểm đẳng điện (*pI*) được thực hiện bằng chương trình Biology Workbench version 3.2 sẵn có trên mạng (<http://biowb.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>).

2.3 Southern Blot

DNA từ lá non của cây cọ dầu được ly trích bằng phương pháp cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Murray và Thompson, 1980) và được cắt với bốn enzyme cắt giới hạn: *HindIII*, *NotI*, *EcoRI* và *TaqI* (Fermentas, Germany). 30 µg DNA sau khi cắt bằng enzyme cắt giới hạn được phân tách trên gel agarose 0.7% (w/v) trong dung dịch điện di 1× Tris-borate. Những phân đoạn DNA trên gel agarose sau đó được chuyển qua màng lai nylon phân cực dương tính nylon Hybond N⁺ (Amersham Biosciences, Sweden) bằng kỹ thuật mao dẫn bằng dung dịch đậm NaOH 0.4N. Màng lai chứa phân đoạn DNA được dùng để lai qua đêm với con dò không đánh dấu phóng xạ. Trong đó, chuỗi nucleotide đầy đủ của *Eg707* cDNA được sử dụng cho việc chuẩn bị con dò dựa theo bộ kit NEBlot® Phototope® Kit (New England BioLabs, UK). Cách thức lai sử dụng cho phân tích Southern được mô tả bởi Church và Gilbert (1984) ở 60°C. Kết quả của sự lai được xác định bằng những phân đoạn DNA thể hiện trên film X-ray (Amersham Biosciences, Sweden).

2.4 Real time RT- PCR

RNA tổng số từ những bộ phận của cây cọ dầu (lá non, mô phân sinh, rễ, hoa cái, tế bào nuôi cấy treo, callus không tạo phôi và callus tạo phôi vô tính) được ly trích bằng phương pháp SDS-phenol/LiCl (Shizadegan *et al.*, 1991). Hai micro-gram của RNA tổng số được dùng để chuyển mã ngược thành chuỗi cDNA nhờ sử dụng bộ kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, USA). Tất cả các con mẫu và con dò (Bảng 1) được thiết kế và tổng hợp bởi Sigma-Proligo (Sigma-Genosys, Sigma-Aldrich Co., USA). Thí nghiệm real time PCR được bố trí lặp lại 3 lần trên hệ thống ABI Prism 7900 Sequence Detection System và kết quả của real time được

phân tích bởi chương trình được cung cấp bởi PE Applied Biosystems (USA). Những nghiệm thức đối chứng (không chứa DNA) cũng được thực hiện cùng lúc cho mỗi lần phân tích. Điều kiện cho phản ứng tổng hợp real time PCR là: 2 phút ở 50°C, 10 phút ở 95°C, và 40 vòng của 15 giây ở 95°C và 1 phút ở 57°C trong hệ thống 384-giếng của ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, USA).

Đường chuẩn được xây dựng để kiểm tra hiệu suất tổng hợp của các cặp con mồi bằng cách pha loãng 5 lần. Mỗi phản ứng PCR gồm có 100 nM mỗi xuôi và mỗi ngược, 250 nM con dò TaqMan (Bảng 1) và 1 lần của hỗn hợp TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems, USA), ở thể tích cuối cùng là 20 µl cho mỗi phản ứng. Xác định lượng biểu hiện gen bằng phương pháp so sánh C_T (Livak và Schmittgen, 2001). Mức độ biểu hiện gen ở các mẫu được so sánh với mẫu được ly trích từ tế bào nuôi cấy treo. Biểu hiện gen của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) trong cò dầu được sử dụng làm gen chuẩn (Acc. No. DQ267444) theo sự mô tả trong bản in số 2 của hệ thống ABI PRISM 7700 Sequence Detection (Applied Biosystems, USA).

Bảng 1: Chuỗi oligonucleotide mồi và con dò cho real time RT-PCR

Name	Sequences of oligonucleotide primers and probes (5'-3')
GAPDH For	GCCAGCTTTAACATCATTCCTAGC
GAPDH Rev	AGCTTTCCATTTAAGGCAGGAAG
GAPDH PRO	Tet-CAACAGCCTTGGCAGCACCAGTGC-Tamra
Eg707 For	CATCCCTCATGGGCTGGTTTC
Eg707 Rev	ACATCCACGAAGTAGAGAATGGC
Eg707 PRO	6-Fam-CGCCCTGAAGTCCACTTGCTCCCA-Tamra

Ghi chú: For: mồi xuôi, Rev: mồi ngược, PRO: con dò

2.5 Lai RNA *in situ*

Bảy giai đoạn phát triển của phôi vô tính (callus phôi, không phải callus phôi, tế bào nuôi cấy treo, phôi dạng hình cầu, phôi dạng hình ngư lôi, giai đoạn nảy mầm, giai đoạn nhiều phôi) và phôi hữu tính ở 15 tuần tuổi sau khi thụ phần (15 WAA) được cố định trong EAF (50% (v/v) cồn, 5% (v/v) acetic acid, 10% (v/v) formaldehyde, 35% (v/v) nước) trong tủ hút. Sau khi mẫu vật được cố định rồi chúng được khử nước ở các mức độ khác nhau của cồn và cuối cùng gắn vào paraffin. Mẫu vật đặt trong paraffin được cắt mỗi lát cắt dày 8µm bằng máy microtome, đặt trên poly-L-lysine microscope slides và phơi khô qua đêm ở nhiệt độ 42°C. Chuỗi xuôi và chuỗi ngược của con dò của cả chuỗi cDNA của *Eg707* được đánh dấu bằng kit digoxigenin (DIG) nucleic acid (Roche Molecular Diagnostics, USA), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lai *in situ* được thực hiện phương pháp Coen (1990) và Jackson (1991) đã được chỉnh sửa cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm (Coen *et al.*, 1990; Jackson, 1991). Dấu hiệu lai được phát hiện bằng kháng thể alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG và nitroblue tetrazolium với 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Roche Molecular Diagnostics, USA) như là chất đệm. Tất cả hình ảnh được ghi lại bằng LEICA microscope DM600DB (Germany).

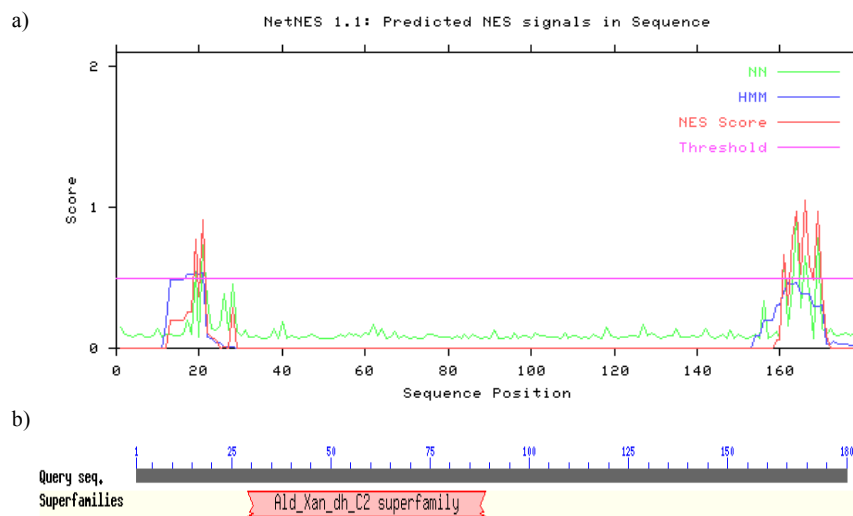
3 KẾT QUẢ

3.1 Phân tích trình tự

Chuỗi trình tự nucleotide đầy đủ của cDNA của dòng *Eg707* gồm có 889 bp. Đoạn đọc cho giải mã (ORF) dài nhất bắt đầu từ vị trí A₁₀₄TG và kết thúc ở vị trí T₆₄₄AG, chúng mã hóa cho một chuỗi polypeptide gồm có 180 amino acids. Chuỗi amino acid của protein này thì giàu leucine (20,15%), valine (10,50%), arginine (8,67%) và proline (5,63%). Nó được dự đoán có khối lượng phân tử là 19457,84 Dalton và có điểm đẳng điện là 8,85. Kết quả BLASTX cho thấy chuỗi amino acid của *Eg707* thì rất giống với một protein mới trên cây cỏ tai chuột (*Arabidopsis thaliana*) (tương đồng NP-001031128; 69%), một protein lạ trên lúa (*Oryza sativa*) (tương đồng ABB47038; 52%) và dự đoán protein MtrDRAFT-AC151964g13v2 trên cây *Medicago truncatula* (tương đồng ABN07969; 50%). Chương trình NES dự đoán có 2 vị trí giàu leucine nằm trên chuỗi polypeptide *Eg707* (Hình 1a). Dựa trên dữ liệu đoạn bảo tồn (CDD, NCBI) thì trên chuỗi polypeptide *Eg707* có đoạn bảo tồn liên họ Ald-Xan-dh-C2 (Hình 1b).

3.2 Phân tích Southern

Để xác định những phiên bản của gen *Eg707* chứa trong bộ gen của cây cỏ dầu, DNA được phân lập từ lá cây cỏ dầu được sử dụng trong phân tích Southern. DNA trong màng lai đã được lai với con dò của chuỗi trình tự đầy đủ *Eg707* cDNA, quá trình lai được rửa trong điều kiện tối hảo và chưa tối hảo. Kết quả lai dưới điều kiện tối hảo chỉ nhận được một tín hiệu lai lần lượt trong các bộ gen được phân cắt ba enzyme cắt giới hạn *EcoRI*, *HindIII* và *NotI* (Hình 2). Trong khi đó, kết quả lai nhận được hai tín hiệu lai tại vị trí 830 bp and 480 bp trong bộ gen được cắt bằng enzyme cắt giới hạn *TaqI* (Hình 2).



Hình 1: Dự đoán dấu hiệu vận chuyển từ nhân ra tế bào chất (a) và đoạn bảo tồn liên họ aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase và molybdopterin binding (Ald-Xan-dh-C2) (từ amino acids 29 đến 89) (b) trong chuỗi amino acid của *Eg707*

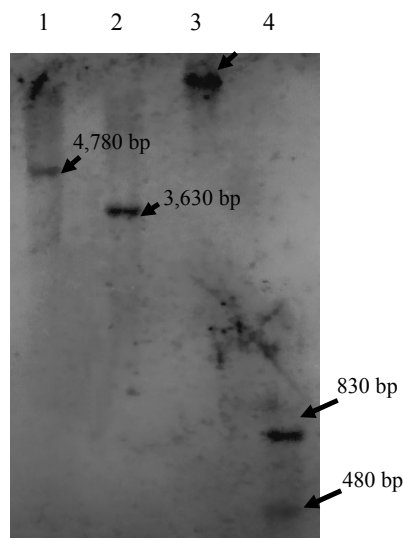
Thêm vào đó, kết quả phân tích của bản đồ enzyme cắt giới hạn cho thấy không có sự hiện diện của ba enzyme cắt giới hạn *EcoRI*, *HindIII*, *NotI* và chỉ có một vị trí của enzyme *TaqI* trong trình tự nucleotid của gen *Eg707*. Kết quả phân tích trong điều kiện lai không tối hảo thì không nhận diện được bất kỳ tín hiệu nào (kết quả không được trình bày). Qua kết quả phân tích từ Southern cho thấy gen *Eg707* có thể là đơn gen trong bộ gen của cây cọ dầu.

3.3 Phân tích biểu hiện gen bằng phương pháp real-time PCR

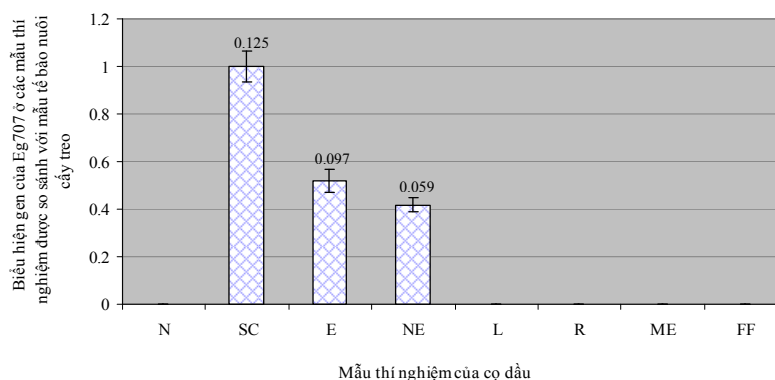
Kết quả phân tích real time PCR (Hình 3) cho thấy mức độ biểu hiện gen của *Eg707* rất thấp ở lá, mô phân sinh, rễ và không có sự biểu hiện ở hoa cái. Có thể gen này không có vai trò trong sự phát triển của tế bào sinh trưởng và sinh dục. Trong những vật liệu nuôi cấy mô, thì sự biểu hiện của gen này rất cao trong tế bào nuôi cấy treo và giảm dần trong tế bào hình thành phôi vô tính và tế bào không hình thành phôi vô tính. Kết quả này cho thấy gen *Eg707* đóng một vai trò quan trọng trong sự hình thành phôi vô tính và phát triển của tế bào nuôi cấy treo của cây cọ dầu.

3.4 Phân tích biểu hiện gen bằng phương pháp lai RNA *in situ*

Lai RNA *in situ* được thực hiện cho các mẫu thí nghiệm có sự biểu hiện gen *Eg707* cao từ kết quả real time PCR và các mẫu ở các giai đoạn phát triển khác nhau của việc hình thành phôi vô tính và hữu tính của cây cọ dầu. Con dò xuôi và con dò ngược đều được sử dụng trong thí nghiệm này và vị trí biểu hiện gen được xác định bằng những dấu hiệu chỉ có từ con dò ngược (Hình 4). RNA thông tin của *Eg707* được phát hiện trong tất cả các tế bào ở giai đoạn đầu hình thành phôi và chỉ được thấy ở một số vị trí nhất định ở phôi trong một vài giai đoạn của quá trình hình thành phôi. Trong giai đoạn hình thành phôi của callus (Hình 4Ab), sản phẩm phiên mã của *Eg707* được phát hiện ở những tế bào mà chúng có thể hình thành những tế bào phân sinh ở giai đoạn sau này. Kết quả lai cho thấy những tế bào phân sinh dạng phân chia được nhuộm và có màu xanh đậm.



Hình 2: Phân tích Southern cho cây cọ dầu được rửa trong điều kiện tối hảo. Mỗi giếng được cho vào 30 µg DNA đã cắt với enzyme cắt giới hạn *EcoRI* (1), *HindIII* (2), *NotI* (3) and *TaqI* (4)



Hình 3: Biểu hiện gen *Eg707* ở các mẫu thí nghiệm của cây cọ dầu được so sánh với mẫu nuôi cấy tế bào treo. N: đối chứng, SC: tế bào nuôi cấy treo, E: callus phôi, NE: callus không hình thành phôi, L: lá, R: rễ, ME: mô phân sinh, FF: hoa cái. Dấu sai số là độ lệch chuẩn

Sự sao chép này nằm ở vùng ngoại biên của những callus không hình thành phôi (Hình 4Bb) hơn là biểu hiện hết tất cả các tế bào của callus hình thành phôi, điều đó cho thấy sự biểu hiện của gen *Eg707* thì cao hơn trong tế bào hình thành phôi và chỉ biểu hiện ở vòng ngoài của những callus không hình thành phôi. Ở tế bào nuôi cấy treo của cây cọ dầu (Hình 4Cb), sự phiên mã được phát hiện ở những tế bào đang phân chia, điều này cho thấy kết quả lai được nhuộm bằng màu xanh đen ở nhân. Song song đó, kết quả phân tích mô học của mô phân sinh, ở callus hình thành phôi và ở những tế bào nuôi cấy treo, nơi mà gen *Eg707* biểu hiện rất cao, đều cho kết quả của sự phát triển mô là giống nhau. Trong giai đoạn hình thành phôi dạng hình cầu, đó là giai đoạn đầu của sự phát triển phôi vô tính của cây cọ dầu và chúng được cấy chuyển qua môi trường không có chất kích thích sinh trưởng (Hình 4Db), kết quả lai nhận thấy một tín hiệu rất yếu của gen *Eg707* được biểu hiện ở những tế bào vòng ngoài của phôi, là những tế bào cho sự phân sinh ngọn, là một lớp đơn xung quanh phôi. Tuy nhiên, những tín hiệu lai xuất hiện xung quanh phôi thì không liên tục nhau, nguyên do của sự không liên tục có thể do bị phân cắt trong quá trình chuẩn bị những mô này. Đối với sự phát triển của phôi dần có dạng hình ngư lôi (Hình 4Eb) và phôi nảy mầm thành nhiều kiểu hình thái nhận thấy một tín hiệu lai rất mạnh tại những tế bào phân sinh và đầu cuối của phôi ở cả hai giai đoạn (Hình 4F). Đặc biệt, sự biểu hiện gen *Eg707* được quan sát trong giai đoạn hình thành nhiều phôi từ quá trình hình thành phôi vô tính (Hình 4Gb) và hình thành phôi hữu tính (Hình 4Hb). Trong sự hình thành phôi vô tính, dấu hiệu nằm ở vị trí những tế bào phân sinh cũng như những tế bào dự trữ tinh bột trong phôi vô tính, sự biểu hiện gen thì thấy ở vòng ngoài, là phần mà những tế bào phân sinh sẽ hình thành.

4 THẢO LUẬN

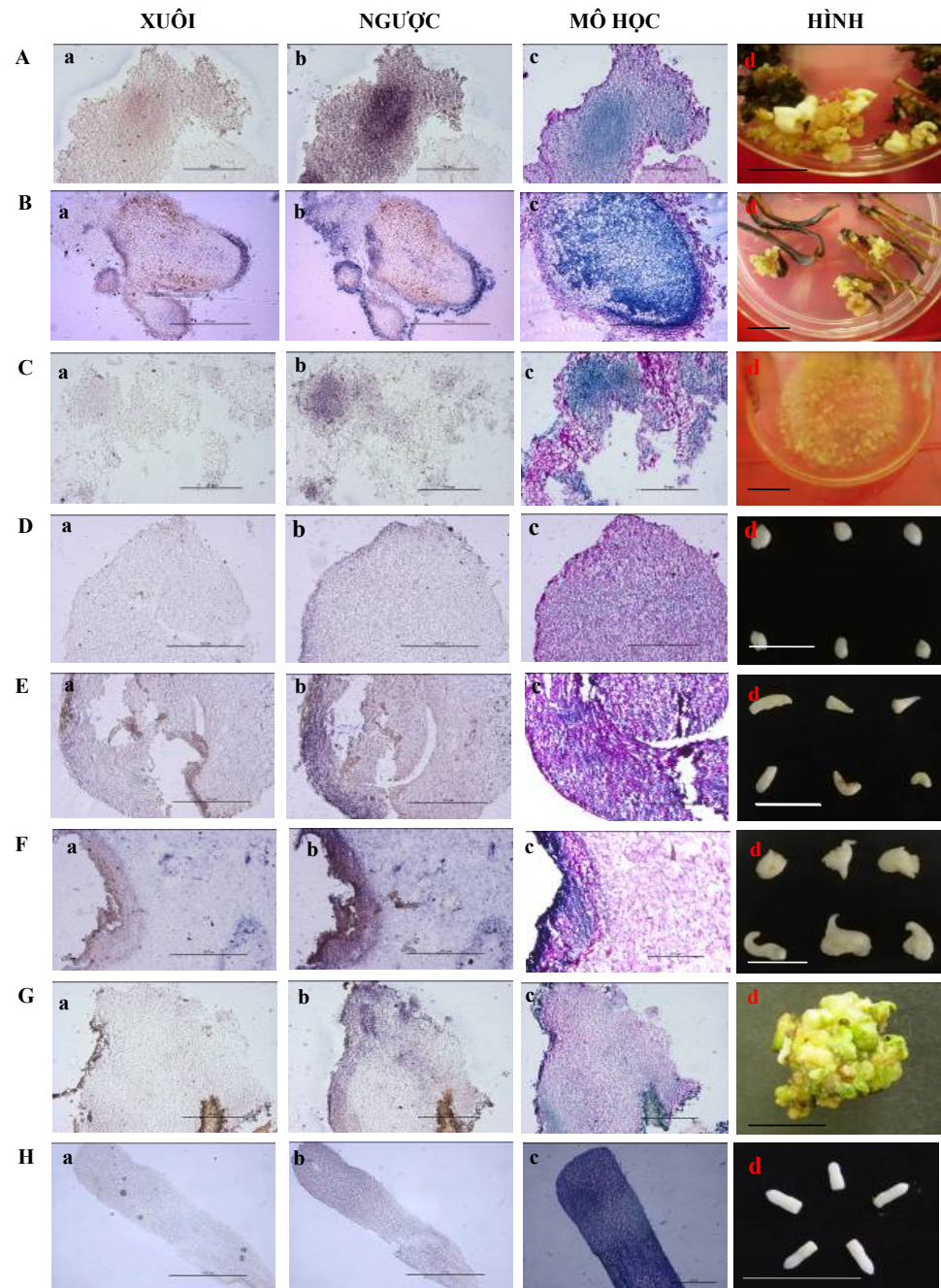
Chuỗi amino acid của *Eg707* được dự đoán có chứa dấu hiệu vận chuyển từ nhân ra ngoài tế bào chất. Dấu hiệu vận chuyển này rất quan trọng để xác định vị trí của protein và cũng xác định mối tương quan của protein này với những protein khác,

đó là một điều cơ bản để xác định sự tồn tại của tế bào (Cour *et al.*, 2004). Haasen *et al.* (1999) chỉ ra rằng bộ máy hoạt động của những protein nhân vận chuyển từ nhân ra ngoài thường mang chức năng bảo tồn trong động vật, nấm men và cây trồng. Ở thực vật, những protein vận chuyển từ nhân ra ngoài đóng vai trò như là những protein điều khiển. Đoạn bảo tồn liên họ Ald-Xan-dh-C2 trên chuỗi amino acid của *Eg707* cũng có trên protein *abscisic aldehyde oxidase 3* (AAO3), protein này cũng được tìm thấy có ở cây cỏ tai chuột (Seo *et al.*, 2000; González-Guzmán *et al.*, 2004); tương tự đoạn bảo tồn này cũng được tìm thấy trong protein *aldehyde oxidase* (AO) của cây bắp (Sekimoto *et al.*, 1997) và của cây lúa mạch (Omarov *et al.*, 1998). Những protein này đều có chung một chức năng liên quan đến quá trình tổng hợp ABA. Câu hỏi đặt ra ở đây là phải chăng protein *Eg707* có liên quan đến quá trình tổng hợp ABA và ảnh hưởng đến quá trình phát triển của trong một số bộ phận của cây cỏ dầu.

Nhìn chung, gen *Eg707* trong tế bào nuôi cấy treo biểu hiện cao (khoảng gấp 2 lần) hơn trong những callus hình thành phôi và những callus không hình thành phôi (Hình 4). Điều này cho thấy gen này biểu hiện suốt trong quá trình hình thành callus và biểu hiện tăng lên trong tế bào nuôi cấy treo. Sự biểu hiện của gen này giống như sự biểu hiện của gen *AtSERK1* (*A. thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1), chỉ biểu hiện ở giai đoạn hình thành phôi (Shah *et al.*, 2001). Giống kết quả nghiên cứu sự biểu hiện gen *DcECP31*, *DcECP40*, *DcECP63* từ cà rốt và *AtECP31*, *AtECP63* từ cây cỏ tai chuột (chúng mã hóa protein LEA (late embryogenesis abundant)) chỉ biểu hiện trong vật liệu nuôi cấy mô, những gen này được biết liên quan đến quá trình hình thành và phát triển của phôi (Chugh và Khurana, 2002).

Kết quả lai RNA *in situ* cho thấy sự biểu hiện gen của *Eg707* bắt đầu từ giai đoạn callus phôi đến sự phát triển của phôi vô tính. Từ lúc hình thành phôi trong giai đoạn callus phôi là một trong những nhân tố đầu tiên để phát triển phôi vô tính của cây cỏ dầu. Từ những kết quả trên, gen *Eg707* có thể sử dụng như là một đánh dấu phân tử để sớm phát hiện sự hình thành phôi vô tính. Thêm vào đó, sự biểu hiện gen của *Eg707* được phát hiện trong cả phôi vô tính và phôi hữu tính, do đó *Eg707* đóng vai trò trong sự hình thành phôi nói chung chứ không chỉ trong giai đoạn hình thành phôi vô tính hay chỉ trong giai đoạn phôi hữu tính. Nói một cách gián tiếp, thì sự phát triển phôi vô tính gần giống như sự phát triển phôi hữu tính. Tuy nhiên, sự hình thành ban đầu thì không giống nhau. *Eg707* chỉ biểu hiện trong suốt quá trình hình thành phôi vô tính, điều này rất thú vị cho việc nghiên cứu gen khởi động và vùng điều khiển trong đoạn gen *Eg707* để làm sáng tỏ cơ chế điều khiển sự biểu hiện của gen này.

Từ những kết quả trên cần có những nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu sự tác động của gen *Eg707* trên những gen khác và xác định cụ thể protein *Eg707* phụ trách giai đoạn nào trong quá trình hình thành phôi vô tính.



Hình 4: Vị trí biểu hiện gen *Eg707* trong vật liệu nuôi cấy mô của cây cọ dầu và phôi hữu tính. Vùng cắt lai với con dò xuôi (a) và con dò ngược (b) của *Eg707* RNA đã được đánh dấu DIG. Hình (c) và (d) chỉ vùng vị trí đánh dấu mô học đã được dung phân tích và những hình ảnh lai RNA *in situ* cho mỗi loại tế bào. Mẫu vật sử dụng là: A callus phôi; B callus không hình thành phôi; C tế bào nuôi cấy treo; D phôi ở giai đoạn hình cầu; E giai đoạn hình ngư lôi; F giai đoạn nảy mầm; G giai đoạn nhiều phôi vô tính; H phôi hữu tính (15 tuần sau khi thụ phấn). Thanh ngang trên hình = 20μm (Aa, Ab, Ac, Ca, Cb, Cc, Ga, Gb, Gc); 50 μm (Hc); 100μm (Bc); 200μm (Ec, Fc) 500μm (Ba, Bb, Da, Db, Dc, Ea, Eb, Fa, Fb); 1000μm (Ha, Hb); 10mm (Ad, Bd, Cd, Dd, Ed, Fd, Gd, Hd)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad S, Ahmad S, Shariff FM, Balu N, Idris NAN (2008) Changing market trends in the oils and fats sector. *Oil Palm Industry Economic J.* 8: 1-11.
- Altschul SP, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-33402.
- Basri MW, Siti Nor Akmar A, Henson IE (2005) Oil palm - achievements and potential. *Plant Production Science* 8: 288-297.
- Boonanuntanasarn S (2008) Gene knockdown: A powerful tool for gene function study in fish. *J. of the World Aquaculture Society* 39: 311-323.
- Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Current Science* 83: 715-730.
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1991-1995.
- Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliot R, Murphy G, Carpenter R (1990) Floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.
- Corley RHV, Tinker PB (2003) Vegetative propagation and biotechnology. In Corley RHV, Tinker PB (eds) *The oil palm*, 4th edn, Oxford: Blackwell Science Ltd., pp 201-215.
- Cour TL, Kierner L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection* 17: 527-536.
- Fristensky B, Balcerzak M, He D, Zhang P (1999) Expressed sequence tags from defense response of *Brassica napus* to *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant Pathology Online* (www.bspp.org.uk/mppol/1999/0301FRISTENSKY).
- González-Guzmán M, Abia D, Salinas J, Serrano R, Rodríguez PL (2004) Two new alleles of the *ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE 3* gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiology* 135: 325-333.
- Gorret N, Rosli SK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha C, Sinskey AJ (2004) Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *J. of Biotechnology* 108: 253-263.
- Haasen A, Köhler C, Neuhaus G, Merkle T (1999) Nuclear export of proteins in plants: *AtXPO1* is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *A. thaliana*. *The Plant J.* 20: 695-705.
- Ho CL, Kwan YY, Choi MC, Tee SS, Ng WH, Lim KA, Lee YP, Ooi SE, Lee WW, Tee JM, Tan SH, Kulaveerasingam H, Alwee SSRS, Abdullah MO (2007) Analysis and functional annotation of expressed sequence tags (ESTs) from multiple tissues of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *BMC Genomics* 8: 381.
- Jackson DP (1991) *In situ* hybridization in plants. In Bowles DJ, Gurr SJ, McPherson M (eds) *Molecular plant pathology: a practical approach*. Oxford University Press, England, pp 163-174.
- Jouannic S, Argout X, Lechauve F, Fizames C, Borgel A, Morcillo F, Aberlenc-Bertossi F, Duval Y, Tregear J (2005) Analysis of expressed sequence tags from oil palm (*Elaeis guineensis*). *FEBS Letters* 579: 2709-2714.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.

- Low ETL, Tan JS, Chan PL, Boon SH, Wong YL, Rozana R, Ooi LCL, Ma LS, Ong-Abdullah M, Cheah SC, Singh R (2006) Developments toward the application of DNA chip technology in oil palm tissue culture. J. Oil Palm Research 87-98.
- Low ETL, Alias H, Boon SH, Shariff EM, Tan CEA, Ooi LCL, Cheah SC, Raha AR, Wan KL, Singh R (2008) Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. BMC Plant Biology 8: 62.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8: 4321-4325. doi:10.1093/nar/8.19.4321.
- Omarov RT, Sagi M, Lips SH (1998) Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. J. Experimental Botany 49: 897-902.
- Ooi SE (2003) An examination of differentially-expressed genes from oil palm embryogenic and non-embryogenic cultures, Dissertation, Universiti Putra Malaysia.
- Parveez GKA, Masri MM, Zainal A, Abdul Majid N, Yunus AMM, Fadilah HH, Rasid O, Cheah SC (2000) Transgenic oil palm: production and projection. Biochemical Society Transaction 28: 969-972.
- Rudd S (2003) Expressed sequence tags: Alternative or complement to whole genome sequences? Trends in Plant Science 8: 321-329.
- Sambanthamurthi R, Singh R, Parveez GKA, Meilina OA, Kushairi A (2009) Opportunities for the oil palm via breeding and biotechnology. In Jain SM, Priyadarshan PM (eds) Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. Springer New York Publisher, New York, pp 377-421.
- Sekimoto H, Seo M, Dohmae N, Takio K, Kamiya Y, Koshiba T (1997) Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. The Journal of Biological Chemistry 272: 15280-15285.
- Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T (2000) The *Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3)* gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 12908-12913.
- Shah K, Vervoort J, de Vries SC (2001) Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. J. Biol. Chem. 276: 41263-41269.
- Shizadegan M, Christie P, Seemann JR (1991) An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. Nucl. Acids Res. 19: 6055.
- Staritsky G (1970) Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. Euphytica 19: 288-292.
- Tarmizi AH, Norjihan MA, Zaiton R (2004) Multiplication of oil palm suspension cultures in a bench-top (2-litre) bioreactor. J. of Oil Palm Research 16: 44-49.
- Willis LB, Gil GA, Lee HLT, Choi DS, Schoenheit J, Ram RJ, Rha C, Sinskey AJ (2008) Application of spectroscopic methods for the automation of oil palm culture. Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme 1: 1-13.
- Wooi KC (1995) Oil palm tissue culture - current practice and constraints. In Rao V, Henson IE, Rajanaidu N (eds) *Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*, Bangi: MPOB Press, Malaysia, pp 21-32.