

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *OSNAC45* LIÊN QUAN TỚI TÍNH CHỊU HẠN VÀO CÂY NGÔ *ZEAMAYS*

Nguyễn Duy Phương¹, Phạm Thu Hằng¹, Cao Lệ Quyên¹, Bùi Thị Thu Hương², Huỳnh Thị Thu Huệ³, Phạm Xuân Hội¹✉

¹Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: xuanhoi.pham@gmail.com

Ngày nhận bài: 09.01.2018

Ngày nhận đăng: 02.7.2018

TÓM TẮT

Thực vật đáp ứng với các điều kiện bất lợi của môi trường thông qua một loạt các quá trình truyền tín hiệu khởi đầu, bao gồm cả quá trình hoạt hóa các nhân tố phiên mã để điều hòa hoạt động của các gen chức năng liên quan tới đáp ứng và chống chịu điều kiện bất lợi hạn. NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) là họ protein đặc trưng của thực vật, có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và đáp ứng điều kiện stress hạn. Gen *OsNAC45* có kích thước 1080 bp chứa một khung đọc mở mã hóa cho protein OsNAC45 của lúa, biểu hiện chủ yếu ở rễ và lá trong điều kiện hạn hán, độ mặn cao, nhiệt độ thấp và acid abscisic. Sự biểu hiện của gen *OsNAC45* trong cây lúa chuyển gen làm tăng cường khả năng chống chịu hạn và mặn. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC45* đã được thiết kế đặt dưới sự điều khiển của promoter hoạt động cảm ứng stress *Rd29A* và chuyển vào cây ngô (*Zea mays*) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Các dòng ngô tái sinh mang một bản sao cấu trúc chuyển gen đã được sàng lọc bằng PCR và Real-time qPCR với cặp mồi đặc hiệu. Một số dòng ngô chuyển gen biểu hiện *OsNAC45* đã được xác định bằng phương pháp RT-PCR bán định lượng mRNA. Các dòng ngô chuyển gen *OsNAC45* thu được là tiền đề cho các nghiên cứu chức năng gen *OsNAC45* sau này, từ đó hướng tới việc tạo ra các giống ngô chuyển gen có khả năng chống chịu tốt với các điều kiện hạn hán.

Từ khóa: Chịu hạn, chuyển gen, nhân tố phiên mã, ngô, *OsNAC45*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô (*Zea mays* L.) là cây trồng chính và là cây lương thực có vai trò kinh tế quan trọng nhất trên thế giới. Theo dự đoán của FAO, nhu cầu về ngô sẽ tăng lên 50% với hơn 800 triệu tấn một năm và có thể vượt qua cả gạo và lúa mì vào năm 2020. Tuy nhiên, do tác động biến đổi khí hậu, hạn hán xảy ra ngày càng thường xuyên, với mức độ ngày càng trầm trọng đang đe dọa mạnh mẽ tới nền sản xuất ngô trên thế giới. Trong bối cảnh đó, công nghệ sinh học được mong đợi sẽ đóng vai trò làm tăng sản lượng ngô đáp ứng đủ nhu cầu ngày một tăng của thế giới.

Tính trạng chịu hạn là tính trạng đa gen, trong đó sự biểu hiện của mỗi gen liên quan chặt chẽ với quá trình phiên mã. Vì vậy, nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã tham gia điều khiển quá trình phiên mã đang là trọng tâm trong các nghiên cứu chọn tạo

giống ngô nhằm tăng cường tính chống chịu của cây trồng với điều kiện hạn. Nhân tố phiên mã NAC là họ nhân tố phiên mã lớn nhất và đặc trưng của thực vật. Nhân tố phiên mã này tham gia vào rất nhiều vào quá trình sinh lý, sinh hóa khác nhau trong tế bào, bao gồm các quá trình phát triển, già hóa, tạo thành tế bào thứ cấp và đáp ứng chống chịu stress môi trường như hạn, mặn và lạnh của tế bào. Một số gen đáp ứng stress hạn thuộc nhóm NAC như *SNAC1*, *SNAC2*, *OsNAC5*, *OsNAC10* đã được chứng minh vai trò chức năng quá trình đáp ứng hạn (Hu *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2007; Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

OsNAC45 là gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ NAC đã được phân lập và nghiên cứu chức năng ở lúa. Protein OsNAC45 đã được chứng minh định vị trong nhân và biểu hiện mạnh trong các điều kiện hạn, mặn, lạnh và xử lý ABA. Các kết quả phân tích

microarray trên cây chuyển gen mô hình cũng cho thấy biểu hiện của gen ngoại sinh *OsNAC45* đã hoạt hóa hàng loạt gen chức năng liên quan đến tính chịu hạn, chứng tỏ *OsNAC45* có tiềm năng là một nhân tố phiên mã điều hòa đáp ứng stress hạn ở lúa nói riêng và thực vật nói chung (Todaka *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2009).

Trong nghiên cứu đã công bố gần đây, chúng tôi đã phân lập thành công gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC45* từ cDNA của giống lúa Mộc Tuyền (Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội, 2016). Để phục vụ mục đích nghiên cứu chức năng của *OsNAC45*, trong nghiên cứu này chúng tôi tiếp tục thiết kế cấu trúc biểu hiện *OsNAC45* và chuyển vào cây ngô mô hình thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho việc nghiên cứu chức năng gen *OsNAC45*, từ đó hướng tới mục tiêu tạo ra các giống ngô chuyển gen có khả năng chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi của môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Gen/vector
Actin-Fw	5'-CCTGGGATTGCCGATCGT -3'	146	<i>Actin1</i>
Actin-Rv	5'-CTGCTGAAAAGTGCTGAGAG-3'		
Hyg-Fw	5'-AAACTGTGATGGACGACACCGT-3'	294	<i>Hygromycin</i> (pCAM-Rd29A)
Hyg-Rv	5'-GTGGCGATCCTGCAAGCTCC -3'		
RD-Fw	5'-AAGCTTCGACTCAAAACAACTTA-3'	1929	[<i>Rd29A:Nos</i>] (pCAM-Rd29A)
NOS-Rv	5'-AGACCGGCAACAGGATTCAA-3'		
NAC45-RT-Fw	5'-TGCCAACACTCGGTGCAAGTA-3'	235	<i>OsNAC45</i>
NAC45-RT-Rv	5'-ACGAATGACATCTCGTAGGG-3'		
NAC45-Fw	5'-GGATCCCCATCGCGCTCGTCTCCAC-3'	1092	<i>OsNAC45</i>
NAC45-Fw	5'GGATCCAATTGATGACCAAACGACC-3'		

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC45*

Vector pCAMBIA1301 mang cấu trúc *Rd29A:NOS* (Phạm Thu Hằng *et al.*, 2014) và pCAMBIA1300 được xử lý đồng thời bằng *EcoRI/HindIII*. Cấu trúc *Rd29A:NOS* được ghép nối vào pCAMBIA1300 mạch thẳng để tạo vector chuyển gen pCAM-Rd. Tiếp theo, đoạn gen *OsNAC45* được tách dòng khỏi pGEM/*OsNAC45* và chèn vào vị trí *BamHI* nằm giữa vùng promoter *Rd29A* và terminator *NOS*. Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi *OsNAC45*-

Nguyên liệu

Giống ngô MB67 do Bộ môn Công nghệ Gen, Viện Nghiên cứu Ngô cung cấp.

Vi khuẩn *E. coli* chủng DH5α được mua từ hãng Fermentas (Mỹ); vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng LBA4404 khả biến được mua từ Công ty Clontech Laboratories (Mỹ). Vector pCAMBIA1300 được mua từ Công ty Marker Gene Technologies (Mỹ); vector pGEM-T (Promega) mang đoạn gen *OsNAC45* (Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội, 2016) và pCAMBIA1301 mang cấu trúc biểu hiện gen *Rd29A:NOS* (Phạm Thu Hằng *et al.*, 2014) do Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền nông nghiệp) cung cấp.

Các cặp oligonucleotide (Bảng 1) sử dụng làm mồi cho PCR được thiết kế dựa trên các trình tự đã được công bố trên GenBank và được đặt mua từ hãng Invitrogen (Mỹ) và Sigma (Mỹ).

Fw/*OsNAC45*-Rv, RD-Fw/*OsNAC45*-Rv và *OsNAC45*-Fw/*NOS*-Rv; xử lý với enzyme cắt giới hạn *BamHI* và *HindIII/EcoRI* và giải trình tự DNA.

Biến nạp vector biểu hiện vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

Vector biểu hiện được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng LBA4404 theo phương pháp sốc nhiệt (Wang, 2006). DNA plasmid (1 µg) được bổ sung vào 100 µL dung dịch tế bào và sốc nhiệt ở 37°C trong 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được cấy trải trên môi trường LB có chứa kanamycin 50 µg/mL, rifampicin 20 µg/mL và ủ ở 28°C trong 2 – 3 ngày. Thể biến nạp sau đó kiểm tra bằng phản ứng PCR trực tiếp

khuẩn lạc (Sambrook, Russel, 2001) với cặp mồi đặc hiệu RD-Fw/NAC45-Rv.

Chuyển nạp gen vào ngô thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Thí nghiệm chuyển nạp gen vào ngô được thực hiện theo quy trình do Bộ môn Công nghệ Gen, Viện Nghiên cứu Ngô cung cấp. Phôi non (10 - 12 ngày sau khi thụ phân) được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang cấu trúc biểu hiện gen pCAM-Rd/OsNAC45. Các phôi hình thành mô sẹo được chọn lọc trên môi trường MS-SE có bổ sung Cefotaxime 200 mg/L, Vancomycin 100 mg/L và Hygromycin 25 mg/L. Các mô sẹo sống sót được tái sinh trên môi trường tái sinh chồi, rễ thành cây hoàn chỉnh.

Xác định kiểu gen của cây chuyển gen bằng PCR và Realtime-RT-PCR

DNA tổng số của cây chuyển gen được tách chiết theo phương pháp của Doyle và Doyle (1990), sử dụng dung dịch CTAB 2%.

Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen đích trong cây chuyển gen được xác định bằng PCR (Sambrook, Russel, 2001) với các cặp mồi Actin-Fw/Actin-Rv, Hyg-Fw/Hyg-Rv, OsNAC45-t-Fw/NOS-Rv. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: (94°C – 30 giây, 56°C – 20 giây, 72°C - 40 giây) x 35 chu kỳ.

Số bản sao của gen chuyển được xác định bằng Realtime PCR theo phương pháp của Zhang và *et al.*, (2003). Phản ứng qPCR được thực hiện với chu trình nhiệt (94°C – 15 giây, 60°C – 30 giây, 72°C - 30 giây) x 40 chu kỳ, sử dụng cặp mồi Hyg-Fw/Hyg-Rv.

Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng phương pháp RT-PCR bán định lượng mRNA

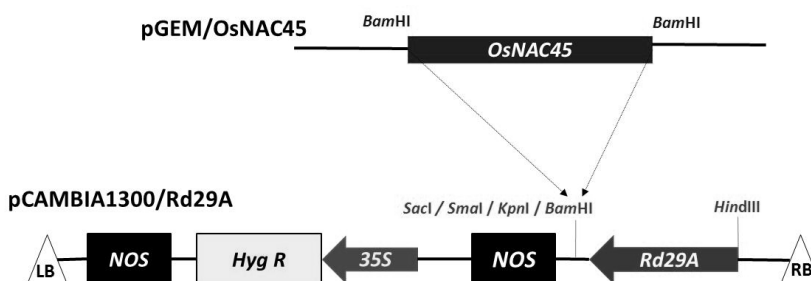
RNA tổng số được tách chiết từ lá ngô non bằng

bộ kit *RNA-spin™ Total RNA Extraction* theo quy trình hướng dẫn của hãng Intron (Hàn Quốc). Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện theo quy trình của hãng Stratagene, sử dụng các mẫu RNA tinh sạch. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 42°C trong 60 phút và bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Mẫu cDNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi NAC45-RT-Fw/NAC45-RT-Rv. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: (94°C – 30 giây, 56°C – 20 giây, 72°C - 40 giây) x 35 chu kỳ. Sản phẩm phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% và phân tích bằng phần mềm ImageJ. Gen *actin* được sử dụng làm gen nội chuẩn.

KẾT QUẢ & THẢO LUẬN

Thiết kế cấu trúc biểu hiện *OsNAC45* điều khiển bởi promoter cảm ứng stress *Rd29A*

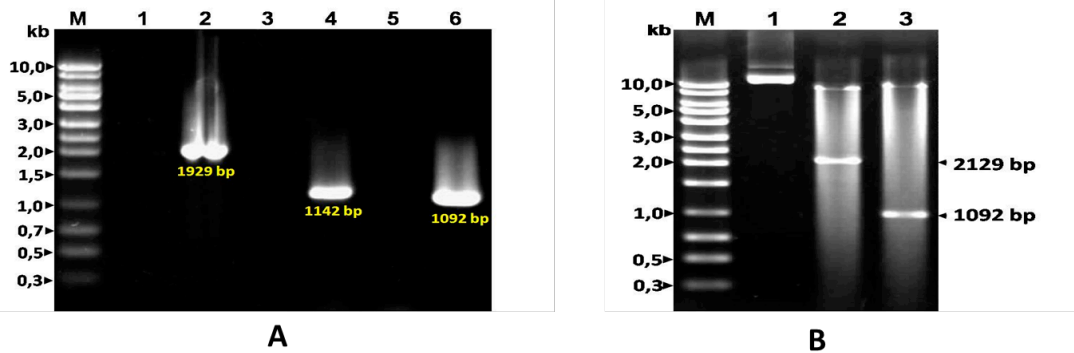
Để thiết kế cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC45* điều khiển bởi promoter *Rd29A* hoạt động cảm ứng stress, cấu trúc [*Rd29A:NOS*] ghép nối vào vector pCAMBIA1300, sau đó đoạn gen *OsNAC45* được chèn giữa vùng promoter *Rd29A* và terminator *NOS* trên vector tái tổ hợp (Hình 1). Sự có mặt của đoạn gen *OsNAC45* trong vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với ba cặp mồi khác nhau: cặp mồi đặc hiệu của *OsNAC45* (NAC45-Fw/NAC45-Rv), cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc [*Rd29A:Nos*] (RD-Fw/NOS-Rv) và cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc [*Rd29A:OsNAC45*] (RD-Fw/NAC45-Rv). Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR từ khuôn là plasmid tái tổ hợp cho 1 băng DNA duy nhất có kích thước lần lượt khoảng 1,1 kb (Hình 2A, giếng 6), 1,15 kb (Hình 2A, giếng 4) và 2,0 kb (Hình 2A, giếng 2); các kích thước này là phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết của các đoạn DNA được nhân bản.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế cấu trúc biểu hiện *OsNAC45* trong tế bào thực vật.

Để kiểm tra chắc chắn hơn đoạn DNA đã được chèn vào vector biểu hiện pCAM-Rd là đoạn gen *OsNAC45*, vector tái tổ hợp pCAM-Rd/*OsNAC45* tiếp tục được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn. Kết quả điện di trên hình 2B cho thấy sản phẩm của phản ứng cắt bằng enzyme *Bam*HI tạo ra 2 băng DNA: băng DNA có kích thước khoảng 10,0 kb tương ứng kích thước bộ khung vector pCAM-Rd mạch thẳng

và băng DNA có kích thước 1092 bp tương ứng kích thước đoạn gen *OsNAC45* (Hình 2B, giếng 3). Tương tự, đối với sản phẩm của phản ứng cắt bằng *Hind*III/*Eco*RI, kết quả điện di cũng xuất hiện 2 băng DNA có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết: băng 2129 kb tương ứng với cấu trúc [*Rd29A:OsNAC45:NOS*] và 10,0 kb tương ứng với bộ khung vector pCAMBIA1300 (Hình 2B, giếng 2).



Hình 2. Thiết kế vector chuyển gen pCAM-RD/*OsNAC45*. Cấu trúc biểu hiện *OsNAC45* được ghép nối vào pCAMBIA1300. (A) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR; giếng 1, 2: PCR với cặp mồi RD-Fw/Nos-Rv; giếng 3, 4: PCR với cặp mồi RD-Fw/NAC45-Rv; giếng 5, 6: PCR với cặp mồi NAC45-Fw/NAC45-Rv; giếng 1, 3 và 5: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2, 4 và 6: khuôn là pCAM-RD/*OsNAC45*. (B) Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn; giếng 1: vector nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn bằng *Hind*III/*Eco*RI; giếng 3: sản phẩm cắt giới hạn bằng *Bam*HI. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb.

Vector tái tổ hợp pCAM-Rd/*OsNAC45* được giải trình tự nucleotide để đảm bảo các cấu trúc (*Rd29A*, *OsNAC45* và *NOS*) được ghép nối đúng vào pCAMBIA1300 và không xảy ra đột biến. Vector tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 phục vụ nghiên cứu chuyển gen vào ngô.

Việc sử dụng các promoter hoạt động liên tục như *35S*, *Ubiquitin* hay *Actin*... để biểu hiện gen quan tâm trong cây chuyển gen thường mang lại hiệu quả rõ rệt. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, sự biểu hiện liên tục của một gen đáp ứng điều kiện stress lại gây ảnh hưởng tiêu cực tới sinh trưởng và phát triển của thực vật trong điều kiện bình thường (Nakashima *et al.*, 2014). Một giải pháp cho vấn đề này là sử dụng các promoter chỉ cảm ứng hoạt động đặc hiệu trong những điều kiện stress nhất định, ví dụ như *Lip9* (*A. thaliana*), *OsNAC6* và *OsLEA3-1* (lúa), *HVA22* (lúa mạch)... Promoter *Rd29A* là một trong số các promoter hoạt động đặc hiệu được phân lập từ *Arabidopsis*, đã được chứng minh cảm ứng với điều kiện hạn, mặn, lạnh và ABA (Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1993). Sự biểu hiện của gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB1 dưới sự điều khiển

promoter *Rd29A* trong các dòng cây chuyển gen mô hình như thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), khoai tây (*Solanum tuberosum*), đậu tương (*Glycine max*), lạc (*Arachis hypogaea*), lúa mì (*Triticum aestivum*) và lúa đã giúp tăng khả năng chống chịu stress nhưng ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng trong điều kiện bình thường (Nakashima *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC45* đặt dưới sự điều khiển của promoter *Rd29A* đã được thiết kế để phục vụ cho các nghiên cứu sau này hướng tới mục tiêu tạo ra giống cây trồng chuyển gen chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường, đồng thời vẫn cho năng suất ổn định trong điều kiện bình thường.

Chuyển cấu trúc biểu hiện *OsNAC45* vào ngô

Cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC45* được chuyển vào hệ gen ngô gián tiếp thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả chuyển gen *OsNAC45* vào ~ 3000 phôi non, sau giai đoạn chọn lọc có 73 phôi/mô sẹo sống sót và tái sinh trên môi trường chọn lọc (Bảng 2). Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen đích trong cây ngô tái sinh được xác định bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen đích *OsNAC45* và gen chọn lọc *Hygromycin* (Hình 3,

Bảng 2). Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy chỉ có 16/73 cây tái sinh mang gen đích *OsNAC45*; tỉ lệ biến nạp gen thành công đạt 0,53 %. Kết quả này cũng cho thấy hiệu quả của gen chọn lọc *Hygromycin* trong quy trình chuyển gen vào giống ngô mô hình không cao, tỉ lệ mô sẹo thoát khỏi ảnh hưởng của chất chọn lọc tương đối lớn (78,1%). Việc nhiều cây tái sinh đã trải qua môi trường chọn lọc không phát hiện được sự có mặt của gen chuyển cũng cho thấy hiệu quả chọn lọc của chất kháng sinh tương đối thấp.

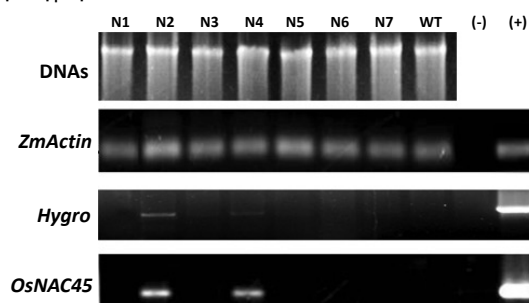
Các cây ngô tái sinh có kết quả PCR dương tính với cả hai cặp mồi đặc hiệu được tiếp tục kiểm tra bằng Realtime PCR để xác định số bản sao của cấu trúc chuyển gen (thông qua định lượng gen *Hygromycin*) trong hệ gen. Kết quả thí nghiệm cho thấy 8/16 cây tái sinh có giá trị $2^{\Delta Ct}$ từ 0,4 – 0,67 tương ứng với 1 bản sao trong hệ gen (Bảng 2). Tuy nhiên, các cây ngô mang một bản sao gen chuyển khi được chuyển sang trồng trong điều kiện nhà lưới, chỉ có 5/8 cây sinh trưởng bình thường và kết hạt (cây T₁).

Bảng 2. Kết quả chuyển gen *OsNAC45* vào cây ngô mô hình.

Lô thí nghiệm	Tổng số phôi	Tái sinh	PCR ¹			Realtime PCR ²		Thu hạt T ₁
			<i>Actin1</i>	<i>Hygromycin</i>	<i>OsNAC45</i>	1 bản sao	>1 bản sao	
Lô I	~1000	25	25	3	3	2	1	0
Lô II	~1000	11	11	1	1	1	0	1
Lô III	~1000	37	37	12	12	5	7	4

Ghi chú: ¹Cây ngô tái sinh được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *Actin1*, gen kháng *Hygromycin* và gen đích *OsNAC45*.

²Thí nghiệm Realtime PCR xác định số bản sao dựa trên định lượng gen *Hygromycin* bằng giá trị $2^{\Delta Ct}$, gen *Actin1* được sử dụng là gen nội chuẩn, thí nghiệm lặp lại 3 lần.



Hình 3. Kiểm tra cây ngô chuyển gen bằng PCR. Cây ngô chuyển gen (N1-N7) và không chuyển gen (WT) được tách chiết DNA tổng số (DNAs) và PCR kiểm tra bằng cặp mồi đặc hiệu của gen nội chuẩn *Actin1* (*ZmActin*), gen kháng *Hygromycin* (*Hygro*) và gen chuyển (*OsNAC45*).

Như vậy, từ khoảng 3000 phôi ngô được chuyển gen ban đầu, 5 cây tái sinh mang 1 bản sao của cấu trúc biểu hiện gen chuyển đã sinh trưởng và kết hạt trong điều kiện nhà lưới. Tỉ lệ chuyển gen thành công của toàn bộ của quy trình đạt 0,17 %.

Trong các nghiên cứu chuyển gen ngô thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được công bố, hiệu suất của quá trình chuyển gen rất khác nhau, dao động từ 0-50% và phụ thuộc chủ yếu khả năng tái sinh và tiếp nhận gen của tế bào. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh có ít nhất một hay một nhóm gen trong nhân tế bào có ảnh hưởng tới khả năng tạo phôi sinh dưỡng

trên môi trường nuôi cấy *in vitro* của ngô (Bohorova *et al.*, 1995). Một số giống ngô đã được chứng minh có hiệu suất tái sinh tương đối cao như (Hi-II - 100%, Gz 643 - 42.2%, A188 - 30%), tuy nhiên hiệu suất chuyển gen cũng rất thấp (Hi-II - 12%, A188 - 5%, H99 - 2%) (Pranjal *et al.*, 2016). Các tác giả cũng sử dụng nhiều loại tế bào/mô khác nhau để chuyển gen như phôi non, phôi trưởng thành, nhị hoa, chồi, chồi thân tái sinh từ mô sẹo..., nhưng phổ biến nhất vẫn là mô sẹo phát triển từ phôi non hay dịch huyền phù môi trường nuôi cấy mô sẹo (Torney *et al.*, 2007). Mặc dù đã có một số quy trình cải tiến đã được công bố, hiệu quả chuyển gen thực tế vào ngô cho đến nay vẫn chưa

được cải thiện đáng kể. Ở Việt Nam, Tran *et al.*, (2017) đã sử dụng phôi non của một số giống ngô lai cho thí nghiệm chuyển gen và thu được hiệu suất chuyển gen tương tự (H95 – 8,6%, N618 – 6,2%).

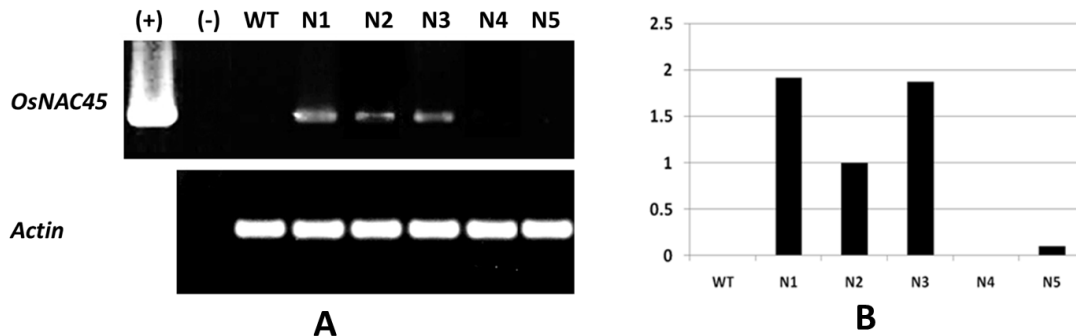
Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phôi non để chuyển gen *OsNAC45* vào giống ngô MB67. Quy trình của chúng tôi mặc dù có tỉ lệ tái sinh chồi khá cao (đạt 66,7%, số liệu không công bố) nhưng tỉ lệ cây được chuyển nạp cấu trúc biểu hiện gen đích thành công rất thấp (0,53%), trong đó có ½ số cây mang 1 bản sao của gen chuyển. Các dòng ngô mang gen đích sinh trưởng bình thường được tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu hoạt động chức năng của gen chuyển.

Đánh giá biểu hiện của *OsNAC45* trong cây ngô chuyển gen

Mức độ biểu hiện của gen đích *OsNAC45* trong các dòng ngô chuyển gen được xác định bằng phương pháp bán định lượng mRNA, sử dụng kĩ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen chuyển. Các dòng ngô chuyển gen sau khi xử lý hạn nhân tạo

(ngừng tưới nước 1 tuần) được tách chiết RNA tổng số để sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR. Mẫu RNA tổng số tách chiết từ cây lúa không chuyển gen được sử dụng làm mẫu đối chứng; gen *actin* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Mức độ biểu hiện của gen *OsNAC45* giữa các dòng ngô được so sánh với nhau thông qua gen nội chuẩn *actin*.

Kết quả phân tích biểu hiện gen bằng RT-PCR cho thấy tất cả các mẫu cây được kiểm tra đều dương tính với PCR sử dụng cặp mồi nội chuẩn (Actin-Fw/Actin-Rv), băng DNA đặc hiệu có độ sáng đồng đều giữa các mẫu xét nghiệm (Hình 4A). Tuy nhiên, trong thí nghiệm sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen đích (*OsNAC45*-RT-Fw/*OsNAC45*-RT-Rv), chỉ có 3 trong số 5 dòng ngô chuyển gen được kiểm tra có biểu hiện gen đích với sự xuất hiện của 1 băng DNA (Hình 4A, dòng N1, N2 và N3) tương tự mẫu đối chứng dương sử dụng khuôn là vector pCAM-Rd/*OsNAC45*. Ngược lại, 2 dòng ngô chuyển gen (Hình 4, dòng N4 và N5) và dòng ngô đối chứng không chuyển gen (Hình 4A, dòng WT) đều cho kết quả PCR âm tính.



Hình 4. Mức độ biểu hiện của *OsNAC45* trong các dòng ngô chuyển gen T₀. (A) Sản phẩm RT-PCR nhân bản đoạn gen đích (*OsNAC45*) và gen nội chuẩn (*Actin*) được điện di trên gel agarose 1%; (+): đối chứng dương (khuôn là pCAM-RD/*OsNAC45*); (-): đối chứng âm (không có DNA khuôn); (WT): khuôn là mẫu RNA tách chiết từ cây ngô không chuyển gen; (N1-N5): khuôn là mẫu RNA tách chiết từ cây ngô chuyển gen. (B) Đồ thị so sánh hàm lượng mRNA *OsNAC45* tương quan giữa các dòng ngô; hàm lượng mRNA *OsNAC45* của dòng N2 có giá trị bằng 1; giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm RT-PCR.

Sử dụng phần mềm ImageJ, mức độ biểu hiện gen *OsNAC45* tương quan giữa các dòng ngô chuyển gen đã được xác định (Hình 4B). Kết quả so sánh cho thấy mức độ biểu hiện của gen đích *OsNAC45* có sự khác biệt giữa các dòng ngô chuyển gen. Cụ thể, hàm lượng mRNA *OsNAC45* cao được phát hiện ở dòng N1 và N3; dòng N2 có mức độ biểu hiện gen đích ở mức thấp; hai dòng N4 và N5 hầu như không phát hiện có mặt của mRNA gen đích, tương tự dòng ngô không chuyển gen.

Như vậy, bằng phương pháp bán định lượng mRNA, chúng tôi đã xác định được sự biểu hiện của

gen chuyển *OsNAC45* trong một số dòng ngô chuyển gen mô hình có mang một bản sao của cấu trúc chuyển gen ở mức độ mRNA.

Trong nhiều nghiên cứu trước đây, thí nghiệm phân tích cây chuyển gen thường được thực hiện với các cây đồng hợp tử từ thế hệ T₂ trở đi để xác định chính xác sự biểu hiện của gen chuyển nhằm tìm hiểu cơ chế điều hòa hoạt động gen của nhân tố phiên mã được nghiên cứu (Hu *et al.*, 2006). Tuy nhiên, với mục đích chứng minh mối liên hệ giữa sự biểu hiện của gen mã hóa nhân tố phiên mã với

sự xuất hiện tính trạng mới của cây chuyển gen, một số nghiên cứu đã phân tích cây chuyển gen ở ngay thế hệ T₀ hay T₁. Ví dụ, khi nghiên cứu chức năng của gen *OsMAPK2*, Hur và Kim (2014) đã phân tích biểu hiện của gen chuyển trong các dòng *A. thaliana* chuyển gen T₁ bằng phương pháp lai RNA. Biểu hiện của gen *OsNAC6* dưới sự điều khiển của promoter *35S* trong các dòng lúa chuyển gen cũng được Rachmat và nhóm nghiên cứu chứng minh bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR ở thế hệ cây chuyển gen T₁ (Rachmat *et al.*, 2014). Ở đây, mức độ biểu hiện gen đích của 5 dòng ngô chuyển gen khác nhau đã được xác định dựa trên kết quả phân tích hàm lượng mRNA bằng kỹ thuật RT-PCR. Mức độ biểu hiện gen đích khác nhau giữa các dòng ngô chuyển gen trong các nghiên cứu này đã cho thấy mỗi dòng cây chuyển gen là một sự kiện chuyển gen độc lập và không đồng nhất về mặt di truyền. Tất cả các dòng ngô biểu hiện gen *OsNAC45* này sẽ được tiếp tục được phân tích khả năng chống chịu hạn ở các thế hệ tiếp theo để chứng minh vai trò chức năng của nhân tố phiên mã *OsNAC45*.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế được cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC45* liên quan tới đáp ứng stress hạn của lúa Mộc tuyền, điều khiển bởi promoter hoạt động cảm ứng stress *Rd29A*. Cấu trúc biểu hiện gen đã được chuyển nạp thành công vào cây ngô mô hình thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* với hiệu suất chuyển gen đạt 0,17%. Các dòng ngô chuyển gen đã được sàng lọc bằng phương pháp PCR xác định sự có mặt và Realtime PCR xác định số bản sao của cấu trúc chuyển gen. Bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng mRNA, sự biểu hiện của *OsNAC45* đã chứng minh được trong các dòng ngô chuyển gen T₀ được xử lý hạn nhân tạo. Các kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về chức năng của *OsNAC45*, từ đó hướng tới việc cải tạo tính trạng chịu hạn của các giống cây trồng nhờ công nghệ chuyển gen thực vật.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen” (2014-2018) do Viện Nghiên cứu hệ gen là chủ trì, thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bohorova NE, Luna B, Britton RM, Huerta LD, Hoistington DA (1995) Regeneration potential of tropical, and subtropical, mid altitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40: 275–281.
- Doyle JJ, Doyle JL, (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(35): 12987–92.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(55): 12987–12992.
- Hur Y, Kim D (2014) Overexpression of *OsMAPK2* enhances low phosphate tolerance in rice and *Arabidopsis thaliana*”, *Am J Plant Sci* 5(4): 452–462.
- Jeong JS, Kim YS, Redillas MC, Jang G, Jung H, Bang SW, Choi YD, Ha SH, Reuzeau C, Kim JK (2013) *OsNAC5* overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnol J* 11(1): 101–114.
- Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta* 239(1): 47–60.
- Nakashima K, Tran LS, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Tto Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* 51: 617–630.
- Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2016) Phân lập gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC45* liên quan tới tính chống chịu hạn của giống lúa Mộc Tuyền *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, 19: 45–50.
- Phạm Thu Hằng, Nguyễn Duy Phương, Trần Lan Đài, Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Xuân Hội (2014) Thiết kế vector biểu hiện mang gen *OsNAC1* được điều khiển bởi promoter cảm ứng điều kiện bất lợi *RD29A*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 30(4): 1-10.
- Pranjal Y, Alok A, Reeva S, Ishwar S, Tanushri K, Arunava P, Pawan KA (2016) Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. *Front Plant Sci* 7: 1949. DOI: 10.3389/fpls.2016.01949.
- Rachmat A, Nugroho S, Sukma D, Aswidinnoor H, Sudarsono S (2014) Overexpression of *OsNAC6* transcription factor from Indonesia rice cultivar enhances

- drought and salt tolerance. *Emir J Food Agric*, 26(6): 519–527.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221–227.
- Tran TL, Ho TH, Nguyen DT (2017) Overexpression of the IbOr gene from sweet potato (*Ipomea batatas* ‘Hoang Long’) in maize increases total carotenoid and β -carotene contents. *Turk J Biol* 41: 1003–1010.
- Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Plant Sci* 6:84. DOI: 10.3389/fpls.2015.00084.
- Torney F, Moeller L, Scarpa A, Wang K (2007) Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Curr Opin Biotechnol* 18(3): 193–9.
- Wang K (2006) *Agrobacterium Protocols*. In *Methods Mol. Biol.* 343, 2nd ed. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 236(2-3): 331–0.
- Zhang Y, Zang D, Li W, Cheng J, Peng Y, Cao W (2003) A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res* 31: e123.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 379(4): 985–989.

STUDY ON GENETIC TRANSFORMATION OF *ZEA MAYS* WITH DROUGHT-RESPONSIVE *OsNAC45* GENE

Nguyen Duy Phuong¹, Pham Thu Hang¹, Cao Le Quyen¹, Bui Thi Thu Huong², Huynh Thi Thu Hue³, Pham Xuan Hoi¹

¹*Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

²*Vietnam National University of Agriculture*

³*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Plants response to abiotic stresses by initiating a series of processes including the activation of transcription factors that can regulate expression of various stress-responsive and adaptive genes. NAC family (NAM, ATAF1/2, CUC2), which is the largest plant transcription factor family, plays an important role in the development and stress responses of plants. *OsNAC10* gene fragment has 1080 nucleotide containing an open reading frame (ORF) encoding for protein OsNAC45. *OsNAC45* is expressed predominantly in roots and leaves and induced by drought, high salinity, low temperature and abscisic acid. Overexpression of *OsNAC45* in rice increased the plant tolerance to drought and high salinity. In this study, recombinant expression vector containing *OsNAC45*-encoding sequence under the control of the *Arabidopsis* stress-inducible *Rd29A* promoter was designed and successfully transformed into model maize plants via *Agrobacterium tumefaciens* bacteria. The genotype of regeneration plants was identified by PCR and Real-time pPCR. Using semi-quantitative RT-PCR, the expression of transgene *OsNAC45* in some T₀ transgenic plants were detected. These results provide a basis for the study of the function of *OsNAC45* in drought responses and for the development of drought stress tolerant crops.

Keywords: *Drought tolerance, gene transformation, maize, OsNAC45, transcription factor*