

THIẾT KẾ VECTOR VÀ CHUYỂN GEN *OsNAC1* LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỊU HẠN VÀO GIỐNG LÚA J02 (*ORYZA SATIVA* L. *JAPONICA*)

Phạm Thu Hằng¹, Đàm Quang Hiếu¹, Phan Tuấn Nghĩa², Phạm Xuân Hội¹

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

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 15.10.2015

Ngày nhận đăng: 20.12.2015

TÓM TẮT

Nhân tố phiên mã NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) là một trong họ protein điều hòa phiên mã lớn nhất ở thực vật, có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và đáp ứng điều kiện hạn. Các nhân tố phiên mã NAC mang một domain liên kết DNA phía đầu N có tính bảo thủ cao (domain NAC) và một domain điều hòa phiên mã phía đầu C có sự thay đổi đa dạng cả về chiều dài và trình tự giữa các nhóm protein NAC. Hơn 100 gen thuộc họ gen này đã được miêu tả ở *Arabidopsis* và lúa. Tuy nhiên, chỉ một vài gen đã được nghiên cứu chức năng. Gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* là một trong những gen thuộc nhóm gen NAC, đã được chứng minh có vai trò tăng cường khả năng kháng hạn ở lúa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành thiết kế cấu trúc biểu hiện gen CaMV35S:*OsNAC1:Nos* và chuyển vào giống lúa J02 (*Oryza sativa* L. *japonica*) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen trong cây chuyển gen được kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Chúng tôi đã thu được các dòng lúa chuyển gen T₀ có mang cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1*. Kết quả thu được là tiền đề cho việc nghiên cứu chức năng gen *OsNAC1* ở lúa, từ đó hướng tới tạo ra các giống cây trồng chuyển gen *OsNAC1* có khả năng chống chịu tốt với điều kiện hạn của môi trường.

Từ khóa: Chịu hạn, cây chuyển gen, *OsNAC1*, nhân tố phiên mã, promoter CaMV35S

MỞ ĐẦU

Hạn hán đang là một trong những vấn đề gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến tình hình sản xuất nông nghiệp không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều quốc gia trên Thế giới. Ở Việt Nam, hạn hán xảy ra ở vùng này hay vùng khác với mức độ và thời gian khác nhau, gây ra những thiệt hại to lớn đối với kinh tế-xã hội, đặc biệt là sản xuất nông nghiệp. Vấn đề càng trở nên cấp thiết khi hầu hết đất canh tác bị hạn nặng lại tập trung ở những vùng đất khó canh tác, vùng sâu, vùng xa nơi mà cuộc sống của người nông dân chủ yếu dựa vào sản phẩm nông nghiệp. Vì vậy, việc tạo ra các giống cây trồng có tính kháng hạn cao có ý nghĩa đặc biệt quan trọng góp phần tăng và ổn định năng suất, xóa đói giảm nghèo, ổn định xã hội.

Nghiên cứu chọn giống cây trồng dựa trên công nghệ chuyển gen thực vật đã trở nên phổ biến trên Thế giới và đang dần được áp dụng ở Việt Nam. Nhiều nghiên cứu chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã tham gia vào đáp ứng điều kiện hạn vào nhiều đối tượng cây trồng đã được tiến hành, kết quả đã tạo

ra những cây chuyển gen tăng cường tính chống chịu với điều kiện hạn (Daisuke *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2010; Nakashima *et al.*, 2012; Redillas *et al.*, 2012]. Các gen mã hóa nhân tố phiên mã không trực tiếp tham gia vào quá trình đáp ứng hạn nhưng sự biểu hiện của chúng lại có vai trò kích hoạt sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng khác tham gia vào quá trình đáp ứng hạn, dẫn tới làm tăng cường khả năng chịu hạn ở thực vật. Chính vì lý do này mà các nghiên cứu về phân lập, đặc tính hoá các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi đã trở thành hướng nghiên cứu đầy tiềm năng để tăng cường sức chống chịu yếu tố môi trường bất lợi của cây trồng.

Nhóm gen mã hóa các protein nhóm NAC đã được chứng minh tham gia vào quá trình chống chịu với điều kiện bất lợi môi trường của thực vật (Nakashima *et al.*, 2012, Nuruzzaman *et al.*, 2013). *SNAC1* là gen mã hóa nhân tố phiên mã họ NAC liên quan đến tính chống chịu với bất lợi môi trường ở lúa đầu tiên được phân lập và nghiên cứu chi tiết đặc tính. Cây lúa được chuyển gen *SNAC1* có khả năng chịu hạn và mặn tăng rõ rệt. Ngoài ra, kết quả phân

tích microarray cũng cho thấy sự biểu hiện của gen ngoại sinh *SNAC1* đã hoạt hóa hàng loạt gen chức năng liên quan đến tính chịu hạn. Kết quả thử nghiệm trên đồng ruộng các cây lúa chuyển gen *SNAC1* cho năng suất cao hơn 22-34% so với các cây đối chứng ở điều kiện hạn (Hu *et al.*, 2006). Tương tự, nhóm nghiên cứu của Shinozaki đã phân lập và nghiên cứu đặc tính của gen *OsNAC6*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ngoài việc tăng cường tính chống chịu với bất lợi thời tiết, cây lúa được chuyển cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC6* còn tăng cường tính kháng bệnh bạc lá so với nhóm cây đối chứng. Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen *OsNAC6* làm giảm khả năng sinh trưởng của cây chuyển gen trong điều kiện bình thường (Nakashima *et al.*, 2007). Bằng kỹ thuật microarray, Jeong và đồng tác giả (2010) đã xác định được 18 gen NAC có sự tăng cường mức độ biểu hiện, trong đó có gen *OsNAC10* ở giống lúa *J02* (*Oryza sativa* L. *Japonica*). Sự biểu hiện của gen *OsNAC10* trong cây chuyển gen làm tăng cường khả năng chống chịu hạn, mặn và lạnh ở giai đoạn phát triển dinh dưỡng của cây, và đặc biệt làm tăng cường khả năng chống chịu hạn trong giai đoạn sinh sản. Cây lúa được chuyển gen *OsNAC10* có hệ rễ phát triển hơn và có năng suất cao hơn so với cây đối chứng trong cả điều kiện bình thường và điều kiện hạn hán [Jeong JS *et al.*, 2010]. Cũng giống như gen *OsNAC10*, cây lúa chuyển gen *OsNAC5* (Jeong *et al.*, 2010) và *OsNAC9* (Redillas *et al.*, 2012) dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter đặc hiệu rễ, có hệ

rễ phát triển dày và dài hơn so với cây đối chứng trong điều kiện hạn. Cây lúa chuyển gen *OsNAC5* và *OsNAC9* có khả năng chống chịu hạn tốt hơn và có năng suất cao hơn so với cây đối chứng.

Ở nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế và chuyển nạp cấu trúc biểu hiện gen 35S:*OsNAC1*:*NOS* vào giống lúa *J02* mô hình thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho việc nghiên cứu chức năng gen *OsNAC1*, từ đó hướng tới mục tiêu tạo ra các giống cây trồng chuyển gen có khả năng chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi của môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector biểu hiện trong tế bào thực vật pBIG 101 mang trình tự promoter CaMV35S (pBI-35S) và vector tách dòng pGEMT mang trình tự gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* (pGEMT-*OsNAC1*) do phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Chúng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp.

Các cặp oligonucleotide sử dụng làm mồi cho phản ứng PCR được đặt mua từ hãng Sigma (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các cặp oligonucleotide.

Tên mồi	Trình tự	Gen đích
NAC1-Fw	5'- GGATCCATGGGGATGGGGATGAGGAG -3'	<i>OsNAC1</i>
NAC1-Rv	5'- GGATCCTCAGAACGGGACCATGCCCA -3'	<i>OsNAC1</i>
NAC1-t-Fw	5'- GAACAACAGCAGCCTGTTCG -3'	<i>OsNAC1</i>
35S-Fw	5'-CCCACATCCTTCGCAA-3'	<i>CaMV35S</i>
NOS-Rv	5'- AGACCGGCAACAGGATTCAA-3'	<i>NosT</i>
HYG-Fw	5'- AAAGTGTGATGGACGACACCGT-3'	<i>Hygromycin</i>
HYG-Rv	5'- GTGGCGATCCTGCAAGCTCC-3'	<i>Hygromycin</i>
GUS-Fw	5'-ATGGTAGATCTGAGGGTAAA-3'	<i>GUS</i>
GUS-Rv	5'- TCACACGTGGTGGTGGTGGT-3'	<i>GUS</i>

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter *CaMV35S*

Vector tách dòng pGEMT-*OsNAC1* và vector biểu hiện pBI-35S được xử lý đồng thời với

enzyme *Bam*HI. Trình tự mã hóa của gen *OsNAC1* được ghép nối vào vector biểu hiện tại vùng nhân dòng đa điểm cắt nằm giữa vùng promoter 35S và vùng kết thúc phiên mã *NosT* nhờ enzyme T4 Ligase (Invitrogen). Thể biến nạp sau khi sàng lọc bằng phản ứng PCR với hai cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Rv và 35S-Fw/NAC1-Fw được nuôi

trong môi trường LB để tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp.

Biến nạp vector biểu hiện vào vi khuẩn *Agrobacterium LBA4404*

Các vector biểu hiện được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *Agrobacterium* chủng LBA4404 theo phương pháp sốc nhiệt. 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, streptomycin 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 với cặp môi đặc hiệu.

Chuyển nạp gen vào lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Các hạt lúa J02 được cấy trên môi trường NB có chứa 2,4-D 2,5 mg/l ở điều kiện nhiệt độ 28°C trong 4 tuần để tạo callus (mô sẹo). Vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector biểu hiện được nuôi lắc trong môi trường YEM (có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 µg/ml, streptomycin 50 µg/ml, rifampicin 20 µg/ml) đến khi OD₆₀₀ đạt giá trị 0,6 – 0,8. Các cụm callus được ngâm trong dung dịch vi khuẩn trong 15 phút trước khi được chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy R2 có bổ sung Acetosyringone 200 µM. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các cụm callus được chuyển lên môi trường chọn lọc R2 có chứa kháng sinh cefotaxime 250 mg/l, hygromycin 50 mg/l. Sau mỗi 2 tuần, callus được chuyển sang môi trường chọn lọc mới. Sau hai lần chọn lọc, các cụm callus sinh trưởng bình thường được chuyển sang môi trường tái sinh chồi có chứa 2 mg/l NAA và 3 mg/l BAP. Chồi non tái sinh từ mô sẹo được chuyển sang môi trường tạo rễ để hình thành bộ rễ đầy đủ trước khi được đưa ra trồng ở môi trường nhà lưới.

Cây chuyển gen T₀ được sàng lọc bằng phản ứng PCR với cặp môi NAC-t-Fw (đặc hiệu cho gen

OsNAC1) và NOS-Rv (đặc hiệu cho vùng kết thúc phiên mã *Nos*). Các cây T₀ dương tính được chuyển sang chậu đất trồng để thu hạt T₁.

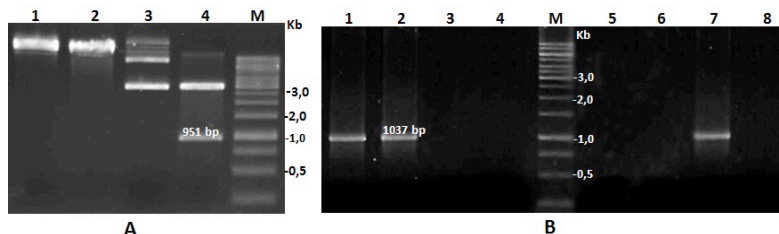
Tách chiết DNA tổng số từ mô lúa

DNA tổng số của cây chuyển gen được tách chiết theo phương pháp của Doyle và cộng sự [Doyle JJ *et al.*, 1990], sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nito lỏng, sau đó được bổ sung 500 µl dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. Hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn hợp sau được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA tinh sạch.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã OsNAC1 dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter 35S

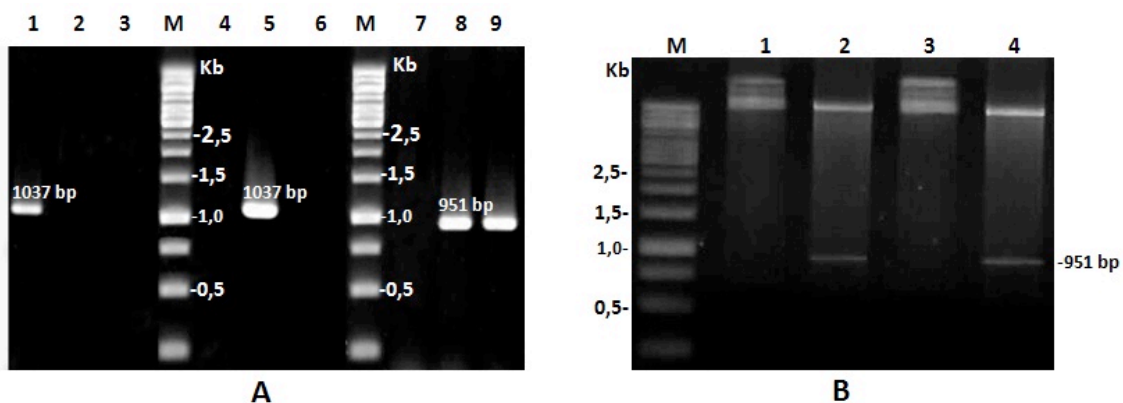
Đoạn gen chứa trình tự mã hóa nhân tố phiên mã OsNAC1 (lấy từ vector pGEMT/OsNAC1) vào vector biểu hiện pBI-35S, được xử lý 2 vector bằng enzyme *Bam*HI (Hình 1A). Các sản phẩm cắt giới hạn được tinh sạch từ gel agarose và thực hiện phản ứng ghép nối nhờ tác dụng của enzyme T4 ligase. Do enzyme *Bam*HI tạo ra các sản phẩm cắt giới hạn có đầu dính giống nhau nên đoạn gen *OsNAC1* có thể được ghép nối trực tiếp vào vector mạch thẳng pBI-35S đã được loại gốc phosphate enzyme Phosphatase kiềm nhằm loại bỏ khả năng tự đóng vòng trong phản ứng ghép nối. Bằng PCR với 2 cặp môi 35S-Fw/NAC1-Rv và 35S-Fw/NAC1-Fw, hai loại thể biến nạp mang 2 loại vector tái tổ hợp vector khác nhau: vector chứa trình tự mã hóa OsNAC1 xuôi chiều (sense) pBI-35S/NAC1-S và vector chứa trình tự mã hóa OsNAC1 ngược chiều (antisense) pBI-35S/NAC1-AS được sàng lọc (Hình 1B).



Hình 1. Sản phẩm ghép nối trình tự gen *OsNAC1* vào vector pBI-35S. **A.** Sản phẩm cắt giới hạn pBI-35S (giếng 1&2) và pGEMT/*OsNAC1* (giếng 3&4) bằng *Bam*HI; giếng 2&4: sản phẩm cắt giới hạn; giếng 1&3: vector nguyên bản. **B.** Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuôn lạc với cặp môi 35S-Fw/NAC1-Rv (giếng 1-4) và 35S-Fw/NAC1-Fw (giếng 5-8); giếng 4, 8: đối chứng âm (khuôn là H₂O); giếng 1 – 3 & 5-6: khuôn là khuôn lạc số 1 – 3. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1kb.

Sự có mặt của gen *OsNAC1* trong vector tái tổ hợp được khẳng định, plasmid từ các thể biến nạp dương tính được tinh sạch và kiểm tra bằng PCR và cắt giới hạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy, với cặp mồi NAC1-Fw/NAC1-Rv, cả 2 vector tái tổ hợp đều cho băng DNA gần 1,0 kb, tương ứng với kích thước của gen *OsNAC1* là 951 bp (Hình 2A, giếng 8 & 9). Với cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Rv, chỉ có sản phẩm PCR từ vector pBI-35S/NAC1-S cho kết quả dương tính (Hình 2A, giếng 5). Ngược lại, với cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Fw, chỉ có sản phẩm PCR từ vector pBI-

35S/NAC1-AS cho kết quả dương tính (Hình 2A, giếng 1). Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *Bam*HI đã cho băng DNA có kích thước gần 1,0 kb đúng theo tính toán lý thuyết của đoạn gen *OsNAC1* (Hình 2B, giếng 2 & 4). Các kết quả này chứng tỏ việc thiết kế thành công vector biểu hiện pBI-35S mang 2 trình tự có nghĩa (sense) và đối nghĩa (antisense) của gen *OsNAC1*, đặt dưới sự điều khiển của promoter 35S. Cả hai vector tái tổ hợp này sẽ được sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu biểu hiện của gen *OsNAC1* trong cây mô hình.



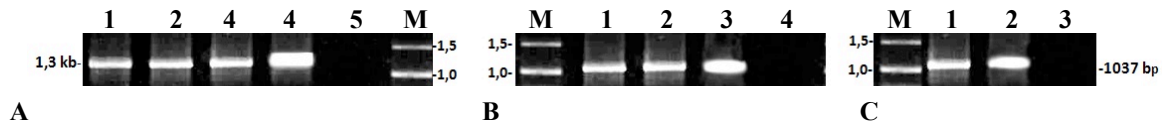
Hình 2. Kiểm tra sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pBI-35S/NAC1-S và pBI-35S/NAC1-AS. **A.** Sản phẩm PCR trên gel agarose 1%; giếng 1 - 3: PCR với cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Fw; giếng 4 - 6: PCR với cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Rv; giếng 7 - 9: PCR với cặp mồi NAC1-Fw/NAC1-Rv; giếng 2,5&9: khuôn là pBI-35S/NAC1-S; giếng 1, 4 & 8: khuôn là pBI-35S/NAC1-AS; giếng 3, 6 & 7: đối chứng âm (khuôn là H₂O). **B.** Sản phẩm cắt enzyme giới hạn pBI-35S/NAC1-S và pBI-35S/NAC1-AS bằng *Bam*HI; giếng 2&4: sản phẩm cắt giới hạn bằng *Bam*HI; giếng 1&3: vector nguyên bản. Giếng M: Thang DNA chuẩn 1 kb.

Biến nạp vector tái tổ hợp pBI-35S/*OsNAC1* vào vi khuẩn *Agrobacterium*

Để nghiên cứu biểu hiện của gen *OsNAC1* trong cây chuyển gen mô hình, hệ vector biểu hiện pBI101 mang promoter điều khiển CaMV35S, bao gồm pBIG101 (vector trống không mang gen), pBI-35S/*OsNAC1*-S (vector mang trình tự mã hóa có nghĩa của *OsNAC1*) và pBI-35S/*OsNAC1*-AS (vector mang trình tự mã hóa đối nghĩa của *OsNAC1*) được lần lượt biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* bằng phương pháp sốc nhiệt, sử dụng N₂ lỏng như đã trình bày ở trên. Sự có mặt của vector biểu hiện trong thể biến nạp xuất hiện trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc. Đối với khuẩn lạc được biến nạp vector pBI101, cặp mồi đặc hiệu cho gen chỉ thị GUS trong phản ứng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc được sử dụng. Kết quả điện

di sản phẩm PCR thu được có một băng DNA duy nhất có kích thước 1,3 kb, tương ứng với kích thước của gen GUS theo tính toán lý thuyết (Hình 3A, giếng 1-4). Đối với các khuẩn lạc được biến nạp vector pBI-35S/*OsNAC1*-S và pBI-35S/*OsNAC1*-AS, lần lượt 2 cặp mồi 35S-Fw/NAC1-Rv và 35S-Fw/NAC1-Fw được sử dụng cho phản ứng PCR kiểm tra khuẩn lạc. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là các khuẩn lạc trên gel agarose 1% cho thấy một băng DNA duy nhất có kích thước là 1037 bp (Hình 3B, giếng 1-2 và Hình 3C, giếng 1), tương ứng với kích thước băng DNA của phản ứng đối chứng dương sử dụng plasmid làm khuôn (Hình 3B, giếng 3 và Hình 3C, giếng 2).

Kết quả PCR trực tiếp từ khuẩn lạc đã chứng tỏ các thể biến nạp thu được là các dòng vi khuẩn *Agrobacterium* mang các vector biểu hiện.



Hình 3. Sản phẩm PCR kiểm tra các khuẩn lạc *Agrobacterium* được biến nạp vector tái tổ hợp. **A.** Sản phẩm PCR khuẩn lạc được biến nạp vector pBI101 bằng mồi GUS-F/GUS-R: giếng 1-3: khuẩn lạc 1-3, giếng 4 đối chứng dương (khuôn là plasmid pBI101), giếng 5: đối chứng âm (khuôn là nước); **B.** Sản phẩm PCR khuẩn lạc được biến nạp vector pBI-35S/NAC1-S bằng mồi 35S-Fw/NAC1-Rv: giếng 1-2: khuẩn lạc 1-2, giếng 3 đối chứng dương (khuôn là plasmid pBI-35S/NAC1-S), giếng 4: đối chứng âm (Khuôn là nước); **C:** Sản phẩm PCR khuẩn lạc được biến nạp vector pBI-35S/NAC1-AS bằng mồi 35S-Fw/NAC1-Fw: giếng 1: khuẩn lạc, giếng 2 đối chứng dương (khuôn là plasmid pBI-35S/NAC1-AS); giếng 3: đối chứng âm (khuôn là nước). M: marker 1 Kb



Hình 4. Các giai đoạn tạo cây lúa chuyển gen mang cấu trúc 35S:OsNAC1:Nos. **A.** Callus hình thành từ phôi trưởng thành trên môi trường NB tạo callus. **B.** Đồng nuôi cấy callus và vi khuẩn *Agrobacterium* mang gen OsNAC1. **C.** Callus trên môi trường chọn lọc có Hygromycin 50 mg/l và Cefotaxim 400 mg/l. **D.** Callus trên môi trường tái sinh có Hygromycin 30 mg/l và Cefotaxim 400 mg/l. (E) Chồi lúa non trên môi trường tạo rễ. **F, K.** Các dòng lúa đưa ra đất trồng trong điều kiện nhà lưới.

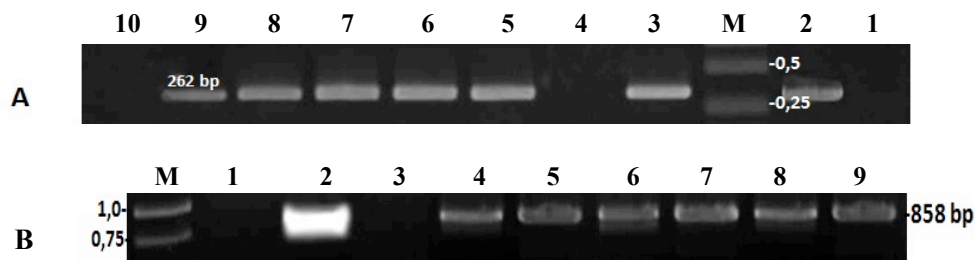
Chuyển cấu trúc 35S:OsNAC1:Nos vào lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Để đánh giá biểu hiện của gen *OsNAC1* trong điều kiện *in vivo*, cấu trúc biểu hiện mang trình tự mã hóa của *OsNAC1* được chuyển vào cây lúa. Cấu trúc biểu hiện mang trình tự đối nghĩa của *OsNAC1* cũng được chuyển vào cây với mục đích sử dụng là các mẫu đối chứng trong thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen.

Các chủng *Agrobacterium* mang vector biểu hiện được nuôi cấy và cho lây nhiễm vào vào cụm callus lúa hình thành từ phôi trưởng thành theo quy trình đã trình bày ở trên. Mảnh lá non của cây chuyển gen ở giai đoạn kéo dài thân được thu lại để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc mang gen chuyển bằng PCR. DNA tổng số được

tách chiết từ mảnh lá non và sử dụng trực tiếp làm khuôn cho phản ứng PCR.

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy tất cả sản phẩm PCR sử dụng khuôn là mẫu DNA tách chiết từ các mẫu lá cây chuyển gen đều cho 1 băng DNA duy nhất có kích thước bằng đúng kích thước của phản ứng đối chứng dương sử dụng plasmid làm khuôn, lần lượt là 262 bp (pBI101-35S/*OsNAC1*-S) và 858 bp (pBI101-35S/*OsNAC1*-AS) (hình 5A, B). Kết quả thu được chứng tỏ chúng tôi đã thu được những dòng lúa chuyển gen T_0 mang các cấu trúc biểu hiện mong muốn. Các dòng lúa này tiếp tục được chuyển sang môi trường tái sinh rễ để hình thành bộ rễ đầy đủ trước khi đưa ra trồng ở điều kiện nhà lưới. Hạt của cây T_0 được thu lại để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 5. Sản phẩm PCR mẫu DNA tách chiết từ các dòng lúa được chuyển vector biểu hiện pBI101-35S/*OsNAC1*-S (**A**) và pBI101-35S/*OsNAC1*-AS (**B**) với cặp mồi NAC1-test/NosT-Rv. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb, giếng 1: đối chứng âm không có DNA khuôn, giếng 2: đối chứng dương sử dụng plasmid làm khuôn, giếng 3 – 10 (hình A) và giếng 3-9 (hình B): khuôn là 276 các mẫu DNA tách chiết từ các dòng lúa chuyển gen.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế thành công vector tái tổ hợp pBI101 mang promoter CaMV35S điều khiển biểu hiện gen *OsNAC1* mã hóa nhân tố phiên mã liên quan tới tính chịu hạn ở lúa. Các cấu trúc vector pBI-35S/*NAC1*-S (mang trình tự có nghĩa của *OsNAC1*) và pBI-35S/*NAC1*-AS (mang trình tự đối nghĩa của *OsNAC1*) đã chuyển nạp thành công vào giống lúa *J02* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. Bằng phương pháp PCR, sử dụng các mẫu DNA tách chiết từ các mẫu lúa chuyển gen, chúng tôi đã thu được các dòng lúa mang cấu trúc gen chuyển. Các kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về chức năng của *OsNAC1* trong cây lúa, từ đó hướng tới việc tạo ra các dòng lúa có khả năng chống chịu cao

nhờ công nghệ chuyển gen thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Daisuke T, Kazuo S, Kazuko YS (2015) Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Plant Biotechnol J* 6(84): 1-20.
- 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.

Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do Choi Y, Kim M, Reuzeau C, Kim JK (2010) Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol* 153(1): 185-97.

Jeong JS, Kim YS, Redillas MCFR, 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: 101-114.

Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim.Biophys* 1819: 97-103.

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.

Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* 4: 248.

Redillas MC, Jeong JS, Kim YS, Jung H, Bang SW, Choi YD, Ha SH, Reuzeau C, Kim JK. (2012) The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol J* 10: 792-805.

CONSTRUCTION OF VECTOR AND TRANSFORMATION OF DROUGHT-RESPONSIVE GENE *OsNAC1* INTO *J02 (ORYZA SATIVA L. JAPONICA)* RICE

Pham Thu Hang¹, Dam Quang Hieu¹, Phan Tuan Nghia², Pham Xuan Hoi¹✉

¹Agricultural Genetic Institute, Vietnam Academy of Agricultural Science

²University of Science, Vietnam National University

SUMMARY

NAC (including NAM - no apical meristem, ATAF1/2 - Arabidopsis transcription activation factor and CUC2 - cup-shaped cotyledon), which is the largest plant transcription factor family, plays an important role in development and stress responses in plants. Protein of this family is characterized by a highly conserved DNA binding domain, known as NAC domain in the N-terminal region. In contrast, the C-terminal region of NAC proteins, usually containing the transcriptional activation domain, is highly diversified both in length and sequence. More than 100 members of this family have been identified in rice. However, only a few of them have been functionally characterized, especially in rice. Gene encoding transcription factor *OsNAC1* has been proved to play an important role in drought stress in plants. The CaMV35S promoter derived from the common plant virus, cauliflower mosaic virus (CaMV), is a component of transgenic constructs in more than 80% of genetically modified (GM) plants. It is the promoter of choice for plant genetic engineering, as it is a strong and constitutive promoter. In this study, an expression vector harboring *OsNAC1* in the form of *CaMV35S:OsNAC1:Nos* was constructed and transferred into *J02 (Oryza sativa L. Japonica)* rice plants via *Agrobacterium tumefaciens*. The presence of the transgene was confirmed by PCR using *OsNAC1* specific primers. T₀ *CaMV35S:OsNAC1:Nos* transgenic lines were selected from transgenic plants. The obtained results are expected to be further exploited for development of stress tolerant rice varieties in the future.

Keywords: Drought tolerance, transgenic plants, *OsNAC1*, transcription factor, *CaMV35S* promoter

✉ Author for correspondence: Tel: +84-4-37481321; E-mail: xuanhoi.pham@gmail.com