

PHÂN LẬP GEN *OsNAC10* LIÊN QUAN TỚI TÍNH CHỐNG CHỊU HẠN TỪ GIỐNG LÚA *Indica*.

Phạm Thu Hằng, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội

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

Ngày nhận bài: 09.4.2014

Ngày nhận đăng: 09.6.2014

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. 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 bất lợi. Gen *OsNAC10* được biểu hiện chủ yếu ở rễ và hoa trong điều kiện hạn hán, độ mặn cao và acid abscisic. 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 sinh dưỡng của cây, và đặc biệt là tăng cường khả năng chống chịu hạn trong giai đoạn sinh sản. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa cho nhân tố phiên mã *OsNAC10* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý hạn. Trình tự phân lập được có kích thước 1183 bp, chứa một khung đọc mở mã hóa cho protein *OsNAC10* có độ dài 516 bp. Kết quả phân tích trình tự axit amin suy diễn cho thấy nhân tố phiên mã *OsNAC10* của giống lúa *Indica* có 171 axit amin, có mức độ tương đồng đạt 92,03% và 99,17% so với hai trình tự *OsNAC10* của giống lúa *Japonica* đã công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới (mã số NM_001072159.1 và NM_001072566.2). Protein *OsNAC10* của giống *Indica* mang một trình tự tín hiệu định vị nhân PRDRKYP đặc trưng cho các nhân tố phiên mã và bốn vùng peptide bảo thủ của họ protein NAC.

Từ khóa: Chối hạn, chuyển gen, lúa *Indica*, nhân tố phiên mã, *OsNAC10*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưới điều kiện bất lợi của môi trường như hạn, mặn, lạnh..., thực vật phải thay đổi các quá trình sinh lý và sinh hóa để tồn tại và thích nghi. Ở mức độ phân tử, điều kiện bất lợi môi trường sẽ làm cho thực vật gia tăng mức độ biểu hiện và tích lũy của hàng loạt các gen và protein đáp ứng bất lợi môi trường. Các gen đáp ứng bất lợi môi trường được chia làm 2 nhóm: (1) nhóm gen chức năng trực tiếp chống lại điều kiện bất lợi và (2) nhóm gen điều hòa biểu hiện của các gen chức năng tham gia trực tiếp vào phản ứng chống chịu điều kiện bất lợi (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Các gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là nhóm gen lớn. Nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã mặc dù không tham gia trực tiếp vào phản ứng đáp ứng với điều kiện hạn của thực vật 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. Phát hiện này đã mở ra một hướng nghiên cứu rất mới cho lĩnh vực chọn giống

chuyển gen ở thực vật, đó là chỉ cần chuyển một hay một vài gen mã hóa nhân tố phiên mã thay vì vài trăm gen chức năng vào cây để tăng cường tính chống chịu của cây trồng. Chính vì lý do này mà các nghiên cứu phân lập các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến tính chống chịu với các điều kiện bất lợi đang trở thành định hướng nghiên cứu đầy tiềm năng trong việc chọn tạo giống chịu hạn, mặn, lạnh.

Các nhân tố phiên mã họ NAC chứa trình tự đồng nhất (đầu tiên được phát hiện từ cây đa yếu thảo NAM, từ *Arabidopsis* ATAF1, ATAF2 và CUC) gọi là vùng hoạt động NAC ở đầu N là một họ gen đặc trưng của thực vật, có vai trò quan trọng trong việc xác định mô phân sinh đỉnh chồi, biệt hóa các cơ quan rễ, hoa trong sinh trưởng phát triển thực vật; phản ứng với điều kiện bị tổn thương và tác nhân gây hại tấn công; tăng cường tính chịu hạn, mặn và các điều kiện bất lợi thời tiết (Aida *et al.*, 1999; Collinge, Boller, 2001; Nakashima *et al.*, 2007; Souer *et al.*, 1996). Cho tới nay đã có khoảng 117 gen *NAC* trong hệ gen *Arabidopsis* và 151 gen *NAC* trong hệ gen lúa, 26 gen *NAC* ở họ cam chanh, 152 gen

NAC ở đầu tương và thuốc lá đã được phân lập nhưng chỉ một số ít gen NAC được nghiên cứu chức năng (Hu *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2011; Nuruzzaman *et al.*, 2010; Rushton *et al.*, 2008). Phần lớn protein của gen NAC chứa vùng bám DNA ở tần cùng đầu N có độ bảo thủ cao, trình tự tín hiệu định vị nhân và một vùng tần cùng đầu C biến đổi (Hu *et al.*, 2010).

Gen mã hóa nhân tố phiên mã họ NAC liên quan đến tính chống chịu với bất lợi môi trường ở lúa, *SNAC1* đầu tiên được phân lập và nghiên cứu chi tiết đặc tính (Le *et al.*, 2011). Cây lúa chuyển gen *SNAC1* tăng cường tính chịu hạn, mặn và kết quả phân tích microarray cho thấy 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. Tương tự, nhóm nghiên cứu của Shinozaki và đồng tác giả (2007) đã phân lập và nghiên cứu đặc tính gen *OsNAC6*. Kết quả nghiên cứu cho thấy các cây lúa chuyển gen tăng cường tính chịu hạn, mặn và lạnh. Đặc biệt, ngoài việc tăng cường tính chống chịu với bất lợi thời tiết, cây lúa chuyển gen *OsNAC6* còn tăng cường tính kháng bệnh bạc lá so với cây đối chứng (Nakashima *et al.*, 2007). Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen *OsNAC6* làm giảm khả năng sinh trưởng của cây chuyển gen trong điều kiện bình thường. Ngược lại, gen *OsNAC5* đã được chứng minh là có liên quan đến tính chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường nhưng không gây ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng của cây trong điều kiện bình thường (Takasaki *et al.*, 2010). Trong một nghiên cứu gần đây, Jeong và đồng tác giả (2010) đã sử dụng kỹ thuật microarray để nghiên cứu biểu hiện của các gen trong hệ gen giống lúa *japonica*

dưới các điều kiện bất lợi khác nhau và đã xác định được 18 gen NAC có sự tăng cường mức độ biểu hiện, trong đó có gen *OsNAC10* (Jeong *et al.*, 2010). 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 sinh dưỡng của cây, và đặc biệt là 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.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được gen *OsNAC10* từ một giống lúa *indica* và nhân dòng vào vector pGEMT với mục tiêu làm phong phú nguồn gen phục vụ cho công tác nghiên cứu tạo giống cây trồng chịu hạn, mặn theo định hướng chuyển gen ở Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Giống lúa *Pusa Basmati* do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp; chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α do Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Các loại enzyme giới hạn *EcoRI*/ *NcoI*/ *PstI* sử dụng trong thí nghiệm của hãng Fermentas. Vị trí nhận biết của các enzyme giới hạn theo hình

Các đoạn oligonucleotide dùng cho phản ứng PCR nhân bản gen được thiết kế dựa trên trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng gen thể giới (mã số NM_001072566.2) và tổng hợp bởi hãng Sigma (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mỗi	Trình tự mỗi
NAC10-Fw	5'- GGATCC ATGCCGAGCAGCGGCGGCGC-3' BamHI
NAC10-Rv	5'- GGATC CGGATCCCTACTGCATCTGCAG-3' BamHI
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số từ cây lúa xử lý stress:

Hạt lúa *Indica* được phá ngủ ở 42°C trong 3 ngày, sau đó cho nảy mầm và sinh trưởng 15 ngày trong dung

dịch MS ở 28°C. Cây non được xử lý stress trong 3 h bằng cách: (1) ngâm rễ trong dung dịch NaCl 200 mM (xử lý mặn); (2) ngâm rễ trong dung dịch PEG 20% (xử lý hạn); (3) ngâm rễ trong nước và giữ ở 4°C (xử lý lạnh); (4) đặt cây trên giấy thấm trong không khí (xử lý mất

nước). RNA tổng số được tách chiết từ 5 g lúa đã xử lý stress, sử dụng đệm GITC theo phương pháp của Sambrook (1989).

Tổng hợp cDNA:

Hai µg mẫu RNA tinh sạch được dùng cho phản ứng tổng hợp cDNA bằng bộ kit “sinh tổng hợp cDNA” theo quy trình của hãng Stratagene, sử dụng mỗi oligo dT.

Phân lập gen *OsNAC10*:

Gen *OsNAC10* phân lập từ cDNA của cây lúa đã xử lý stress bằng kỹ thuật PCR với chu kỳ nhiệt: 94°C - 5 phút; (94°C - 30 giây, 56°C - 20 giây, 72°C - 40 giây) x 35 chu kỳ; 72°C - 7 phút và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET™-TM Gel Extraction* của hãng Fermentas.

Nhân dòng gen *OsNAC10*:

Đoạn gen *OsNAC10* nhân bản bằng PCR được nhân dòng bằng bộ kit pGEMT Easy theo qui trình đi kèm của hãng Promega. Plasmid tái tổ hợp pGEMT/*OsNAC10* được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit GenJET™ Plasmid Miniprep của hãng Fermentas và bảo quản ở -20°C.

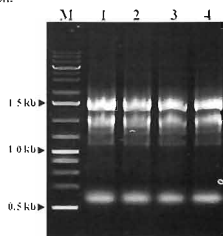
Giải trình tự gen *OsNAC10*:

Trình tự gen được xác định bằng thiết bị tự động ABI 3100 dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger có sử dụng các dideoxyribonucleotide. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Gene Bank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0. Quá trình giải trình tự gen *OsNAC10* được tiến hành tại công ty MacroGen, Hàn Quốc.

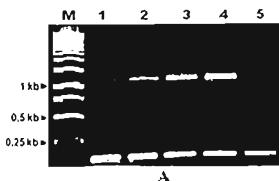
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen *OsNAC10* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress:

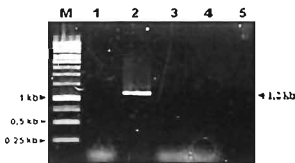
Để phân lập gen *OsNAC10*, chúng tôi đã tiến hành xử lý cây lúa non với các điều kiện stress khác nhau (PEG 20%, NaCl 200 mM, 4°C và để khô trong không khí) và tách chiết RNA tổng số bằng đệm GITC. Kết quả điện di RNA trên gel agarose 1% cho thấy chúng tôi đã thu được các mẫu RNA tinh sạch đảm bảo hàm lượng cho thí nghiệm phân lập gen (Hình 1). Mẫu RNA tinh sạch được chúng tôi sử dụng làm khuôn cho phản ứng sinh tổng hợp cDNA, sử dụng oligo-dT làm mồi. Phản ứng được thực hiện ở 42°C trong 60 phút và sản phẩm được sử dụng trực tiếp làm nguyên liệu cho phản ứng PCR phân lập gen.



Hình 1. Kết quả điện di RNA tổng số xử lý lạnh (giống 1), PEG 20% (giống 2), NaCl 200 mM (giống 3) và hạn (giống 4) trên gel agarose 1%. Giếng M: thang chuẩn 1 kb



A



B

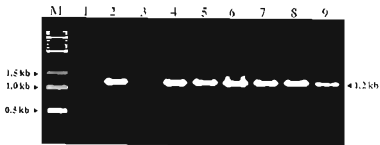
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *OsNAC* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress trên gel agarose 1%. Phản ứng PCR được thực hiện với nhiệt độ gần mỗi 53°C-20 giây (A) và 56°C-20 giây (B), sử dụng khuôn là mẫu cDNA tổng hợp từ RNA tách chiết từ cây lúa được xử lý được xử lý lạnh (giếng 1), PEG 20% (giếng 2), NaCl 200 mM (giếng 3) và hạn (giếng 4). Mẫu đối chứng âm (giếng 5) không có DNA khuôn. Giếng M: thang chuẩn DNA 1kb.

Dựa vào trình tự nucleotide của gen *OsNAC10* được công bố trên ngân hàng gen, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi NAC10-Fw/NAC10-Rv (Bảng 1) để sử dụng cho phản ứng PCR nhân bản đoạn gen *OsNAC10* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress. Phản ứng PCR được thực hiện 35 chu kỳ, ở các nhiệt độ gần mỗi 53°C trong 40 giây và 56°C trong 20 giây. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy ở nhiệt độ gần mỗi 53°C chúng tôi đã thu được băng DNA có kích thước xấp xỉ 1,2 kb, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *OsNAC10*, tuy nhiên trong sản phẩm của phản ứng cũng còn chứa nhiều băng DNA không đặc hiệu (Hình 2A). Khi thực hiện phản ứng PCR với nhiệt độ gần mỗi 56°C trong 20 giây, chúng tôi đã thu được 1 băng DNA đặc hiệu ở phản ứng sử dụng cDNA tổng hợp từ mẫu RNA của cây lúa xử lý trong dung dịch PEG 20%. Sản phẩm thu được có kích thước khoảng 1,2 kb (giếng 2, Hình 2B), đúng với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn gen cần nhân bản là 1159 bp, cho thấy chúng tôi đã phân lập được đoạn gen mong muốn từ cDNA của cây lúa xử lý hạn.

Nhân dòng gen *OsNAC10* vào vector pGEMT

Sản phẩm PCR nhân bản gen *OsNAC10* từ cDNA sau khi tinh sạch bằng bộ kit GenJET-TM Gel

Extraction (Fermentas) được chúng tôi ghép nối trực tiếp với vector pGEM-T, sử dụng bằng bộ kit nhân dòng pGEM®-T Vector System II (Promega). Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α và cấy trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 50 μ g/ml, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Theo lý thuyết, các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường có màu trắng là khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp, trong khi đó các khuẩn lạc có màu xanh là những khuẩn lạc mang plasmid nguyên bản tự đóng vòng. Để xác định sự có mặt của gen *OsNAC10* trong thể biến nạp, chúng tôi chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu NAC10-Fw/NAC10-Rv. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy phản ứng PCR từ khuôn là các khuẩn lạc số 1 và 3 – 8 cho một băng DNA đặc hiệu có kích thước xấp xỉ 1,2 kb, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *OsNAC10* (hình 3, giếng 2, 4 – 9). Ngược lại, ở phản ứng PCR kiểm tra khuẩn lạc số 2 (Hình 3, giếng 3), chúng tôi không thu được băng DNA nào, tương tự như kết quả của phản ứng đối chứng âm (Hình 3, giếng 1). Kết quả này chứng tỏ các khuẩn lạc số 1 và 3 – 8 là những khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pGEM-T chứa đoạn gen mong muốn *OsNAC10*.



Hình 3. Kết quả PCR kiểm tra một số khuẩn lạc trắng với cặp mồi đặc hiệu. Giếng M thang chuẩn DNA 1kb, giếng 1 đối chứng âm (khuẩn là H₂O), giếng 2 - 9: sản phẩm PCR từ khuôn là các khuẩn lạc số 1 – 8.

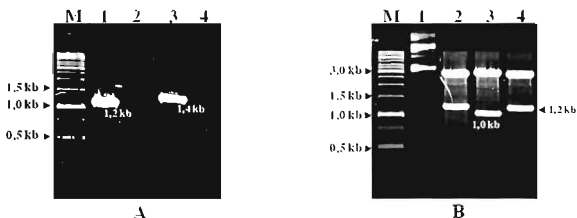
Để khẳng định các khuẩn lạc thu được có thực sự mang plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen *OsNAC10* mong muốn hay không, chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên 1 khuẩn lạc trắng dương tính để nuôi và tinh sạch plasmid theo quy trình của bộ kit GenJETTM-Plasmid Miniprep. Sự có mặt của đoạn gen *OsNAC10* trong plasmid được chúng tôi xác định bằng phương pháp PCR và phương pháp xử lý với enzyme cắt giới hạn.

Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được chúng tôi thực hiện với 2 cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu của

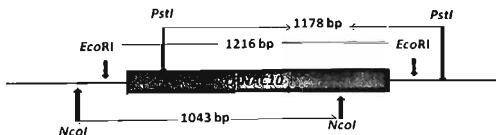
vector pGEM-T (T7/SP6) có khoảng cách 186 bp trên vector pGEM-T và cặp mồi đặc hiệu của đoạn gen *OsNAC10* (NAC10-Fw/NAC10-Rv). Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% trên hình 4 cho thấy với cặp mồi đặc hiệu chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước trước khoảng 1,2 kb (Hình 4A, giếng 1). Sản phẩm PCR với cặp mồi vector cho một băng DNA có kích thước khoảng 1,4 kb, phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết, bao gồm 1159 bp của đoạn gen *OsNAC10* và 186 bp của vector pGEM-T (Hình 4A, giếng 3).

Để khẳng định chắc chắn hơn đoạn DNA đã được chèn vào vector pGEM-T là gen *OsNAC10*, chúng tôi tiến hành thí nghiệm xử lý plasmid tái tổ hợp đã được tinh sạch từ khuẩn lạc dương tính với các enzyme cắt giới hạn khác nhau. Vị trí chèn đoạn gen *OsNAC10* trên vector pGEM-T nằm giữa 2 vị trí nhận biết của enzyme *EcoRI*. Ngoài ra trong trình tự của đoạn gen *OsNAC10* có một vị trí nhận biết của hai enzyme *NcoI* (tại vị trí 157) và *PstI* (tại vị trí 1139), trong khi trên vector pGEM-T cũng có một trình tự nhận biết của các enzyme này. Chính vì vậy chúng tôi sử dụng các enzyme này để xác định sự có mặt của đoạn gen *OsNAC10* trong vector tái tổ hợp. Kết quả thu được

trên hình 4B cho thấy sản phẩm của phản ứng cắt đồng thời bằng *EcoRI* cho hai băng DNA, băng DNA thứ nhất có kích thước khoảng 3,0 kb là bộ khung nguyên bản của vector pGEM-T, băng DNA còn lại chính là đoạn gen *OsNAC10* có kích thước khoảng 1,2 kb (Hình 4B, giếng 2). Đối với phản ứng cắt giới hạn bằng *NcoI* và *PstI*, chúng tôi cũng thu được hai băng DNA có kích thước đúng với các kích thước tính toán lý thuyết (Hình 4B, giếng 3 và 4) (Cụ thể vị trí cắt giới hạn các loại enzyme và kích thước băng thu được thể hiện trong hình 5). Các kết quả thu được này cho phép chúng tôi khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công trình tự mã hóa của gen *OsNAC10* vào vector pGEM-T



Hình 4. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp pGEM/OSNAC10. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% giếng 1 và 3: khuôn là pGEM/OSNAC10, giếng 2 và 4: đối chứng âm (khuôn là H₂O), giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi T7/SP6, giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi NAC10-Fw/NAC10-Rv. (B) Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn trên gel agarose 1%, giếng 1: vector tái tổ hợp pGEM/OSNAC10 nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn bằng *EcoRI*, giếng 3: sản phẩm cắt giới hạn bằng *NcoI*, giếng 4: sản phẩm cắt giới hạn bằng *PstI*. Giếng M: Thang DNA chuẩn 1 kb

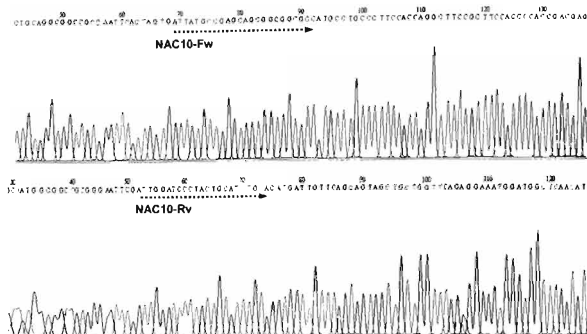


Hình 5. Vị trí nhận biết của các enzyme giới hạn trên plasmid tái tổ hợp pGEM-T/ *OsNAC10*

Phân tích trình tự gen *OsNAC10* của giống lúa *Indica*

Để so sánh đoạn gen *OsNAC10* phân lập được từ giống lúa *indica* với các gen *OsNAC10* của giống lúa *japonica* đã được công bố, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen này trong

vector tái tổ hợp pGEM/OSNAC10 bằng hệ thống máy giải trình tự ABI 3100. Kết quả giải trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm Bioedit (Hình 6) và so sánh với trình tự gen *OsNAC10* của giống lúa *Japonica* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới.



Hình 6. Một phần kết quả giải trình gen *OsNAC10* bằng mỗi SP6 (trên) và T7 (dưới).

		I		II	
<i>OsNAC10-Indica</i>	1: PPSGGAMP-----A-LPPGFRFHPDDEZLVHYLHNQASIKCPVPIIAEVDNYTKN	52			
<i>OsNAC10-Japonica 1</i>	1: PPSGGAMP-----A-LPPGFRFHPDDEZLVHYLHNQASVVKCPVPIIAEVDNYTKN	52			
<i>OsNAC10-Japonica 2</i>	1: PPSGGAMP-----A-LPPGFRFHPDDEZLVHYLHNQASIKCPVPIIAEVDNYTKN	52			
<i>OsNAC4-Japonica</i>	1: HLAAGSSGPRDAELNLPFGFRFHPDDEZLVHYLCRKVAROPLVPVPIIAEVDLYLD	60			
<i>OsNAC5-Japonica</i>	1: PGC-----CG-----A-LPPGFRFHPDDEZLVHYLCRKCGGLPLAFVPIIAEVDLYLD	50			
<i>OsNAC6-Japonica</i>	1: PGG-----GG-----DLQPPGFRFHPDDEZLVHYLCRKAGLPVPIIAEVDLYLD	50			
		III			
<i>OsNAC10-Indica</i>	53: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKSILSTPTSDNIGV	112			
<i>OsNAC10-Japonica 1</i>	53: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKSILSTPTSDNIGV	112			
<i>OsNAC10-Japonica 2</i>	53: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKSILSTPTSDNIGV	112			
<i>OsNAC4-Japonica</i>	61: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKPVAPKGSARTVGI	120			
<i>OsNAC5-Japonica</i>	51: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKPV---GSPRAVAI	107			
<i>OsNAC6-Japonica</i>	51: PVDLPKALFGEEWYFFSPDRKYPNCRPNRAAGSGYWKATGDKPV---GSPKVAI	107			
		IV			
<i>OsNAC10-Indica</i>	113: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLTGTSAN-----MTTT-----	148			
<i>OsNAC10-Japonica 1</i>	113: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLTGTSAN-----STTT-----	148			
<i>OsNAC10-Japonica 2</i>	113: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLTGTSAN-----NTTT-----	148			
<i>OsNAC4-Japonica</i>	108: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLADVRDAGGKXGSO-----KLDEWVLCRLYNKK	174			
<i>OsNAC5-Japonica</i>	108: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLADVDRSAAARKLSKSSMHALRDDVLCRIYNKK	167			
<i>OsNAC6-Japonica</i>	108: KKALVYKCKPPKPGVKTDWIKHEYRLADVDRSA---RK---KN---S-LRLDDVLCRIYNKK	160			
		V			
<i>OsNAC10-Indica</i>	149: -----TG-Q-P-R-ASSXT-----	158			
<i>OsNAC10-Japonica 1</i>	149: -----TG-Q-P-R-ASSXT-----	158			
<i>OsNAC10-Japonica 2</i>	149: -----TG-Q-P-R-ASSXT-----	158			
<i>OsNAC4-Japonica</i>	175: NNKEVKVLEGGDVASVAAAAPNNHHHONGEVNDAAA---DTSSDSFOTHSDSDINASAG	231			
<i>OsNAC5-Japonica</i>	168: GVIERTDVTDAGEDVPSAAAALAKGGR-IGGGGGAALKVLSDTYGFYDQRPES-ENLCF	225			
<i>OsNAC6-Japonica</i>	161: GGLEKPPAALVAALGVSSGGGVCCKPHVGVNAAVSSPP-EQKPVVAG---PAPPPLAAY	216			

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein *OsNAC10* của giống lúa *Indica* (*OsNAC10-indica*) so với các protein *OsNAC3*, *OsNAC4*, *OsNAC10*. *OsNAC6* của giống *Japonica* đã công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới. Vùng tín hiệu định vị nhân được kí hiệu bởi dấu (*), các vùng bảo thủ của protein NAC được kí hiệu từ I-IV

Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn trình tự chứa gen *OsNAC10* phân lập được từ giống lúa *Indica* có chiều dài 1183 bp và trình tự nucleotide có mức độ tương đồng so với trình tự đã được công bố mã số NM_001072159.1 và NM_001072566.2 đạt lần lượt là 75,3 % và 90,9%. Trình tự DNA phân lập được chứa khung đọc mở mã hóa cho protein *OsNAC10* có độ dài 171 axit amin, trong đó có một vùng tín hiệu định vị nhân PRDRKYP phổ biến cho các nhân tố phiên mã và bốn vùng bảo thủ đặc trưng của họ protein NAC (Hình 7) (Ishida *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2000). Kết quả so sánh trình tự axit amin suy diễn cho thấy trình tự axit amin của gen *OsNAC10* của giống lúa *indica* có mức độ tương đồng so với hai trình tự *OsNAC10* của giống *japonica* đã công bố là 92,03% (mã số NM_001072159.1) và 99,17% (mã số NM_001072566.2). Tuy nhiên, các vị trí axit amin sai khác đều nằm ở phía đầu C, không thuộc phạm vi các vùng bảo thủ của protein NAC và có lẽ không gây ảnh hưởng tới hoạt động chức năng của protein.

Từ các kết quả thu được ở trên, chúng tôi có thể kết luận đã phân lập và nhân dòng thành công gen *OsNAC10* mã hóa cho nhân tố phiên mã NAC10 tham gia vào quá trình đáp ứng stress ở giống lúa *Indica*. Sản phẩm nhân dòng sẽ được chúng tôi tiếp tục sử dụng cho các nghiên cứu tạo giống cây chuyển gen *OsNAC10*.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp RT-PCR, sử dụng mẫu RNA tổng số tách chiết từ thân cây lúa được xử lý hạn, chúng tôi đã phân lập thành công gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC10* của giống lúa *Indica*. Đoạn gen phân lập đã được chúng tôi nhân dòng thành công vào vector pGEMT và giải trình tự đầy đủ. Gen *OsNAC10* của giống lúa *Indica* có mức độ tương đồng 98% so với trình tự gen *OsNAC10* của giống lúa *Japonica* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới. Sản phẩm nhân dòng gen *OsNAC10* sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu cho nghiên cứu tạo giống cây chuyển gen có khả năng chống chịu cao với các điều kiện stress.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bởi nguồn kinh phí của quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia – NAFOSTED và nguồn vật liệu giống lúa *indica* của Trung tâm Công nghệ sinh học và Kỹ thuật Di truyền Quốc tế An Độ (ICGEB).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: inter-action among the cup-shaped cotyledon and shoot meristemless. *Gene Dev* 126: 1563-1570.
- Collinge M, Boller T (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC1*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46: 521-529.
- Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G (2010) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* 10: 145.
- Ishida T, Aida M, Takada M (2000) Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 60-67.
- Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O'Shea C, Skriver K (2010) The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem J* 426: 183-196.
- 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.
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res* 18: 263-276.
- 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, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S (2007) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465: 30-44.
- Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, Chen X, Laudeman TW, Timko MP (2008) Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the *Solanaceae*. *Plant Physiol* 147: 280-295.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 7: 19-22.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58(2): 221-7.

Souer E, Von Houwelingen A, Kloos J, Mol J, Koes R (1996) The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85: 159-170.

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Nakashima K (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC3 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics* 5: 173-183.

Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* 14: 3024-3036.

ISOLATION OF OsNAC10 GENE INVOLVED IN DROUGHT TOLERANCE FROM *INDICA* RICE

Phạm Thu Hằng, Nguyễn Duy Phương and Phạm Xuân Hối*

Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

SUMMARY

Plants response to adverse environment by initiating a series of signaling processes including 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 a important role in development and stress responses in plant. OsNAC10, is expressed predominantly in roots and panicles and induced by drought, high salinity, and abscisic acid. Overexpression of OsNAC10 in rice increased the plant tolerance to drought, high salinity, and low temperature at the vegetative stage. More importantly, the OsNAC10 plants showed significantly enhanced drought tolerance at the reproductive stage. In this study, we isolated *OsNAC10* gene from drought-treated *Indica* rice cDNA. As a result, the length of *Indica* rice *OsNAC10* cDNA is 1183 nucleotides, contains a 516 bp-ORF encoding for OsNAC10 protein. Amino acid sequence alignment of *Indica* OsNAC10 protein and homologs GeneBank-registered OsNAC10 (NM_001072159.1 and NM_001072566.2) shows that they had striking homology (92.03% and 99.17%, respectively). Analysis of its deduced amino acid sequence indicated that this protein contains four conserve domains and one putative nuclear localization signal at N-terminal like all well-known NAC proteins.

Keywords: Drought tolerance, gene transformation, *Indica* rice variety, *OsNAC10*, transcription factor

* Author for correspondence: Tel/Fax: +84-4-37557764; E-mail: xuanhoi.pham@gmail.com