

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *OsNAC1* LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỊU HẠN VÀO GIỐNG LÚA *Japonica*

Phạm Thu Hằng¹, Nguyễn Duy Phương¹,Phan Tuấn Nghĩa², Phạm Xuân Hội¹

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. 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. Trong nghiên cứu này, đã chuyển nạp cấu trúc biểu hiện gen *Ubi:OsNAC1:Nos* vào giống lúa *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 cặp mồi đặc hiệu và phương pháp geol hat trên môi trường có kháng sinh hygromycin. Đã thu được các dòng lúa chuyển gen T₁ 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 các điều kiện bất lợi của môi trường.

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

1. MỞ ĐẦU

Dưới điều kiện bất lợi của môi trường như hạn, mặn, lạnh,... thực vật phải có những đáp ứng cả về hình thái, sinh lý và hóa sinh để tồn tại và thích nghi. Ở mức độ phân tử, yếu tố môi trường bất lợi làm gia tăng mức độ biểu hiện và tích lũy của hàng loạt các gen và protein đáp ứng stress trong tế bào thực vật [8]. Các gen đáp ứng điều kiện môi trường bất lợi được chia làm 2 nhóm: (1) nhóm gen chức năng mã hóa các protein trực tiếp tham gia vào đáp ứng với điều kiện bất lợi và (2) nhóm gen điều khiển mã hóa các protein điều hòa sự biểu hiện của các gen chức năng liên quan tới đáp ứng chống chịu yếu tố stress. Các gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là một nhóm gen lớn gồm nhiều họ gen. Nhóm gen này 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 stress, dẫn tới làm tăng cường khả năng chống chịu các yếu tố stress, bao gồm cả stress hạn, ở thực vật [9]. Thực tế này đã mở ra một hướng nghiên cứu mới cho lĩnh vực nghiên cứu chọn giống cây trồng dựa trên công nghệ

chuyển gen 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 về phân lập, đặc tính hóa các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi đã trở thành định hướng nghiên cứu đầy tiềm năng trong nghiên cứu tăng cường sức chống chịu yếu tố môi trường bất lợi như hạn, mặn, lạnh, nhiệt độ cao... của cây trồng.

Họ NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) là họ gen lớn nhất thuộc nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã được tìm thấy ở thực vật, có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển cũng như đáp ứng điều kiện bất lợi của thực vật. Đặc điểm chung của các protein NAC là có một domain (vực) có tính bảo thủ rất cao ở đầu N, có chức năng liên kết ADN và được gọi là vùng NAC. Ngược lại, vùng polypeptit ở đầu C có mức độ bảo thủ thấp, rất đa dạng cả về chiều dài và trình tự, thường chứa các domain có chức năng điều hòa [2]. Cho tới nay, các nhà khoa học đã phát hiện được khoảng 117 gen *NAC* trong hệ gen của *Arabidopsis*, 151 gen trong hệ gen của lúa, 152 gen ở đậu tương, 26 gen ở họ cam chanh, tuy nhiên chỉ một số ít gen trong số này được nghiên cứu chức năng đầy đủ [6].

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

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

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

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 [2]. 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 [4]. Tiếp theo, một số gen thuộc họ *NAC* của lúa như *OsNAC5*, *OsNAC10*,... cũng được chứng minh là có liên quan đến tính chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường [10, 4, 3].

Trong nghiên cứu đã công bố trước đây, chúng tôi đã thiết kế hệ vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* được phân lập từ giống lúa Japonica, đặt dưới sự điều khiển của promoter hoạt động liên tục *Ubiquitin* [7]. Ở nghiên cứu này,

tiếp tục nghiên cứu chuyển nạp cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1* vào giống lúa Japonica 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.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vector biểu hiện trong tế bào thực vật, mang trình tự mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* được điều khiển bởi promoter hoạt động liên tục *Ubiquitin* của ngô (pBI-Ubi/*OsNAC1*) do phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp [7].

Chủng 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 oligonucleotit sử dụng làm mẫu cho phản ứng PCR được đặt mua từ Hãng Sigma (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các cặp oligonucleotit

Tên mỗi	Trình tự	Gen đích	Mục đích sử dụng
NAC1-Fw	5'-GGATCCATGGGGATGGGGATGAGGAG-3'	<i>OsNAC1</i>	PCR kiểm tra <i>Agrobacterium</i>
NAC1-Rv	5'-GGATCCTCAGAACGGGACCATGCCCA-3'	<i>OsNAC1</i>	PCR kiểm tra <i>Agrobacterium</i>
NAC1-tFw	5'-GAACAACAGCAGCCTGTTG-3'	<i>OsNAC1</i>	PCR kiểm tra cây chuyển gen
NOS-Rv	5'-AGACCGGCACAGCATTCAA-3'	<i>NosT</i>	PCR kiểm tra cây chuyển gen
HYG-Fw	5'-AAACTGTGATGGACGACACCGT-3'	<i>Hygromycin</i>	PCR kiểm tra cây chuyển gen
HYG-Rv	5'-GTGGCGATCCTGCAAGCTCC-3'	<i>Hygromycin</i>	PCR kiểm tra cây chuyển gen

2.2. Phương pháp

2.2.1. 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. ADN 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, rifampixin 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 mồi đặc hiệu.

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

Hạt lúa (*Japonica*) 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, rifampixin 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 axetosyringone 200 µM. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các cụm callus được chuyển lên môi trường chọn lọc R2 có chứa kháng sinh cefotaxim 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 hooc môn NAA 2 mg/l và BAP 3 mg/l. 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.

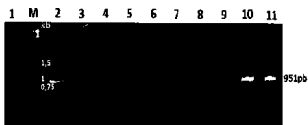
Cây chuyển gen T_0 được sàng lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi NAC1-Fw (đặc hiệu cho gen *OsNAC1*) và NOS-Rv (đặc hiệu cho vùng kết thúc phiên mã *Nos*). Các cây T_0 dương tính được chuyển sang chậu đất trồng để thu hạt T_1 .

2.2.3. Tách chiết ADN tổng số từ mô thực vật

ADN tổng số của cây chuyển gen được tách chiết theo phương pháp của Doyle và cộng sự [1], sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nito lỏng, sau đó được bổ sung 500 μ l dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNaza 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. Hỗn hợp phenol: clorofom: 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 ADN tinh sạch.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biến nạp vector pBI-Ubi/*OsNAC1* vào vi khuẩn *Agrobacterium*



Hình 1. Kết quả PCR trực tiếp khuẩn lạc *Agrobacterium* mang pBI-Ubi/*OsNAC1*

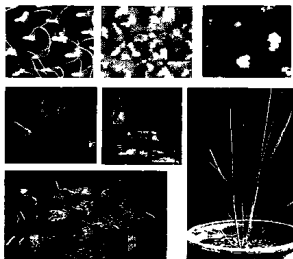
Giếng 1: đối chứng âm (không có ADN khuôn); giếng 2: đối chứng dương (khuôn là pBI-Ubi/*OsNLI-IF*); giếng 3 – 11: khuôn là các khuẩn lạc mang vector pBI-Ubi/*OsNAC1*; giếng M: thang chuẩn ADN 1 kb.

Để nghiên cứu biểu hiện của gen *OsNAC1* trong cây chuyển gen mô hình, đã sử dụng hệ vector biểu hiện pBI101 được thiết kế mang promoter điều khiển *Ubiquitin* [6]. Vector biểu hiện pBI-Ubi/*OsNAC1* được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium* bằng phương pháp sốc nhiệt, sử dụng N_2 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 khuẩn lạc, sử dụng cặp mồi NAC1-Fw/NAC1-Rv. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên

gel agarosa 1% cho thấy đối với các phản ứng sử dụng khuôn là các thể biến nạp, đã thu được một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 0,9 kb (hình 1, giếng 3-11), tương tự như sản phẩm của phản ứng đối chứng dương sử dụng vector pBI-Ubi/*OsNAC1* làm khuôn (hình 1, giếng 2). Kết quả này chứng tỏ các thể biến nạp thu được là các dòng vi khuẩn *Agrobacterium* có mang vector tái tổ hợp pBI-Ubi/*OsNAC1*.

3.2. Chuyển cấu trúc *Ubi:OsNAC1:Nos* vào lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

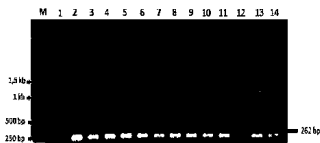
Để đánh giá biểu hiện của gen *OsNAC1* trong điều kiện *in vivo*, đã tiến hành thí nghiệm chuyển cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1* vào cây lúa (hình 2). Chúng *Agrobacterium* mang vector biểu hiện được nuôi cấy và cho lây nhiễm vào cụm callus lúa hình thành từ phôi trưởng thành theo quy trình đã trình bày ở trên. Sau bước tái sinh callus, đã thu được 72 dòng lúa có khả năng tái sinh trên môi trường có hygromycin 50 mg/l (bảng 2). Mảnh lá non của các dòng lúa tái sinh được thu lại để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen đích bằng kĩ thuật PCR. ADN tổng số được tách chiết từ mảnh lá non theo phương pháp của Doyle [1] và sử dụng trực tiếp làm khuôn cho các phản ứng PCR.



Hình 1. Kết quả biến nạp cấu trúc *Ubi:OsNAC1:Nos* vào lúa

(A) Callus hình thành từ phôi trưởng thành trên môi trường NB tạo callus. (B) Dòng nuôi cấy callus và vi khuẩn *Agrobacterium* mang gen *OsNAC1*. (C) Callus trên môi trường chọn lọc có hygromycin 50 mg/l và cefotaxim 250 mg/l. (D) Callus trên môi trường tái sinh có hygromycin 30 mg/l và cefotaxim 250 mg/l. (E) Chồi lúa non trên môi trường tạo rễ. (F, G, H) Các dòng lúa đưa ra đất trồng trong điều kiện nhà lưới.

Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi NAC1-tFw/NOS-Rv trên gel agarosa 1% cho thấy các phản ứng PCR sử dụng khuôn là mẫu ADN tách chiết từ các mẫu lá cây chuyển gen (hình 3, giếng 3-11, 13-14) đều cho 1 băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 260 bp, tương tự như sản phẩm của phản ứng đối chứng dương sử dụng ADN plasmid làm khuôn (hình 3, giếng 2). Ngược lại, với phản ứng đối chứng âm sử dụng mẫu ADN của cây lúa không chuyển gen, ảnh điện di không thu được băng ADN nào (hình 3, giếng 1). Kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã thu được các dòng lúa tái sinh có mang cấu trúc biểu hiện gen *OsNAC1* mong muốn.



Hình 3. Kết quả PCR kiểm tra dòng lúa tái sinh T_0

Sản phẩm PCR cây chuyển gen với cặp mồi NAC-tFw/Nos-Rv được điện di trên gel agarosa 1%. Giếng 1: đối chứng âm (khuôn là AND tách chiết từ cây lúa đại); giếng 2: đối chứng dương (khuôn là pBI-Ubi/*OsNAC1*); giếng 3 – 14: khuôn là AND của các

dòng lúa chuyển cấu trúc Ubi:*OsNAC1*:Nos. Giếng M: thang chuẩn AND 1 kb.

Sau bước sàng lọc bằng PCR, đã thu được 63/72 dòng lúa tái sinh có kết quả PCR dương tính (bảng 2). Các dòng lúa tái sinh này tiếp tục được chuyển sang môi trường tái sinh rễ để tái tạo bộ rễ đầy đủ trước khi đưa ra trồng ở điều kiện nhà lưới. Dưới điều kiện gieo trồng trong nhà kính, đã thu được 24/63 dòng lúa sinh trưởng bình thường, trong đó có 21 dòng trở bông và 17 dòng kết hạt bình thường (bảng 2). Hạt của các dòng lúa này được thụ lại và bảo quản để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả biến nạp cấu trúc biểu hiện *OsNAC1* vào lúa

Giai đoạn	Số dòng lúa
Tái sinh	72
Kiểm tra bằng PCR (dương tính)	63
Sinh trưởng trong nhà kính	24
Trở bông	21
Kết hạt (chắc)	17
Nảy mầm cây T_1	17

3.3. Phân tích đặc điểm di truyền cây chuyển gen T_1



Hình 4. Kết quả sàng lọc các dòng lúa T_1 bằng PCR. Sản phẩm PCR cây chuyển gen T_1 được điện di trên gel agarosa 1%.

(A) PCR với cặp mồi *Actin*-Fw/*Actin*-Rv; giếng 1: khuôn là ADN tách chiết từ cây lúa đại; giếng 2 – 11: khuôn là mẫu ADN tách chiết từ các cây lúa T_1 chuyển cấu trúc Ubi:*OsNAC1*:Nos; giếng 12: đối chứng âm (khuôn là H_2O)

(B) PCR với cặp mồi NAC-tFw/Nos-Rv; giếng 1: đối chứng âm (khuôn là ADN tách chiết từ cây lúa đại); giếng 2: đối chứng dương (khuôn là pBI-Ubi/*OsNAC1*); giếng 3 – 18: khuôn là mẫu ADN tách chiết từ các cây lúa chuyển cấu trúc Ubi:*OsNAC1*:Nos;

Các cây non nảy mầm trên môi trường chọn lọc được tách chiết ADN tổng số và kiểm tra bằng PCR lần 1 với cặp mồi nội chuẩn *Actin*-Fw/*Actin*-Rv. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1% cho thấy tất cả các mẫu tách chiết ADN đều đạt yêu cầu,

sản phẩm PCR nhận bản đoạn gen *actin* đều cho một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 250 bp (hình 4A, giếng 2 – 11; bảng 3). Sự có mặt của gen chỉ thị kháng hygromycin trong các dòng lúa chuyển gen T_1 được xác định bằng phản ứng PCR sử

dùng cặp mỗi đặc hiệu của gen kháng (Hyg-Fw/Hyg-Rv) (bảng 3). Các mẫu ADN tách chiết từ các dòng lúa chuyển gen cho kết quả sàng lọc PCR lần II dương tính được tiếp tục sàng lọc bằng PCR lần III với cặp mỗi đặc hiệu cho gen *OsNAC1* và vùng kết thúc phiên mã *Nos* (NAC-tFw/NOS-Rv) để xác định sự có mặt của cấu trúc *Ubi:OsNAC1:Nos*. Các dòng lúa chuyển gen có kết quả sàng lọc PCR dương tính (bảng 3), trên ảnh điện di sản phẩm PCR xuất hiện một băng ADN duy nhất có kích thước khoảng 262 bp (hình 4B, giếng 3 – 7, 9-11, 12-15,17) được lựa chọn cho các phân tích hình thái và xác định mức độ biểu hiện gen sau này.

Bảng 3. Kết quả sàng lọc các dòng lúa T₁

Tên dòng	Số hạt kiểm tra	Số hạt nảy mầm trên hygromyxin	Số cây có kết quả PCR dương tính		
			Mỗi actin	Mỗi hygromyxin	Mỗi OsNLI-IF
N1	10	7	7/7	7/7	7/7
N2	10	6	6/6	5/6	5/6
N3	10	5	5/5	5/5	5/5
N4	10	7	7/7	6/7	6/7
N5	10	8	8/8	7/8	7/8
N6	10	5	5/5	5/5	5/5
N7	10	7	7/7	7/7	7/7
N8	10	6	6/6	5/6	5/6
N9	10	5	5/5	5/5	5/5
N10	10	5	5/5	5/5	5/5
N11	8	6	6/6	6/6	6/6
N12	10	9	9/9	9/9	9/9
N13	10	8	8/8	7/8	7/8
N14	10	7	7/7	8/8	8/8
N15	10	8	8/8	7/8	7/8
N16	10	7	7/7	7/7	7/7
N17	7	6	6/6	6/6	6/6

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, đã tạo được các chủng vi khuẩn *Agrobacterium* tái tổ hợp mang các cấu trúc biểu hiện gen chứa trình tự mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* có liên quan tới đáp ứng stress của thực vật được điều khiển bởi promoter hoạt động liên tục *Ubiquitin*. Cấu trúc biểu hiện gen đã được chuyển nạp thành công vào giống lúa Japonica thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. Các dòng cây chuyển gen T₁ có mang gen đích có khả năng nảy mầm trên môi trường chọn lọc có bổ sung chất kháng sinh hygromyxin. 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

- Doyle J. J., and Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Hu H., Dai M., Yao J., Xiao B., Li X., Zhang Q., and 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 J. S., Kim Y. S., Baek K. H., Jung H., Ha S. H., Do Choi Y., Kim M., Reuzeau C., Kim J. K. (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 J. S., Kim Y. S., Redillas M. C., Jang G., Jung H., Bang S. W., Choi Y. D., Ha S. H., Reuzeau C., Kim J. K. (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): 101-14.
- Nakashima K., Tran L. S., Nguyen D. V., 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 A. M., Satoh K., Kondoh H. and Ooka H. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465: 30-44.
- Pham T. H., Pham X. H. (2010). Thiết kế vector chuyển gen mang gen điều khiển chịu hạn *OsNAC1* ở lúa. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(3): 345-352.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–223.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.

10. Takasaki H., Maruyama K., Kidokoro S., Ito Y., Fujita Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Nakashima K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol. Genet. Genomics.* 5: 173-183.

STUDY ON GENETIC TRANSFORMATION OF Japonica RICE WITH DROUGHT-RESPONSIVE *OsNAC1* GENE

Pham Thu Hang, Nguyen Duy Phuong,

Pham Xuan Hoi, Phan Tuan Nghia

Summary

Plants response to adverse environment by initiating a series of signaling processes including activation of transcription factors that can regulate expression of arrays of genes for stress response and adaption. 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. In this study, we transformed construct *Ubi:OsNAC1:Nos* into Japonica rice plant using *Agrobacterium tumefaciens*. The presence of transgene was tested by PCR method with *OsNAC1* gene specific primers and germination method with MS medium containing Hygromycin-B. T₁ *Ubi:OsNAC1:Nos* transgenic lines were selected from plant transformation experiments. These results are the base of development of stress tolerant rice varieties for adaptation to the changing climate.

Key words: *Drought tolerance, transgenic plants, OsNAC1, transcription factor, ubiquitin promoter.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 21/5/2015

Ngày thông qua phản biện: 22/6/2015

Ngày duyệt đăng: 29/6/2015