

Phân lập gen mã hóa nhân tố phiên mã OsNAC5 liên quan tới tính chống chịu stress từ giống lúa *Indica*

Nguyễn Duy Phương*, Phạm Thu Hằng, Phạm Xuân Hội

Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Phạm Văn Đồng, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 09 tháng 2 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 6 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 10 năm 2014

Tóm tắt: 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 trong sự phát triển và đáp ứng với điều kiện bất lợi của thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được một đoạn gen mã hóa cho nhân tố phiên mã OsNAC5 từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý hạn. Gen *OsNAC5* phân lập được có chiều dài 993 nucleotide, có mức độ tương đồng về trật tự nucleotide so với trình tự gen *OsNAC5* của giống lúa *Japonica* đã được công bố trên ngân hàng gen thể giới (mã số NM_001072451.1) đạt 98%. Kết quả phân tích trình tự axit amin suy diễn cho thấy nhân tố phiên mã OsNAC5 của giống lúa *Indica* có 330 amino acid, chứa một trình tự tín hiệu định vị nhân PRDRKYP đặc trưng cho các nhân tố phiên mã phía đầu N và năm vùng peptide khác đặc trưng của họ protein NAC.

Từ khóa: Chịu hạn, lúa *Indica*, nhân tố phiên mã, *OsNAC5*, chuyển gen.

1. Mở đầu

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 [1]. 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 lí do này mà các nghiên cứu phân lập, đặc tính hoá các gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983249148
Email: phuondn.bio@gmail.com

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 petunia NAM và 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 [2-5]. 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 đậu tương và thuốc lá đã được phân lập nhưng chỉ một số ít gen NAC được nghiên cứu chức năng [6-9]. Phần lớn protein của gen NAC chứa vùng bám DNA ở tận cùng đầu N có độ bảo thủ cao, trình tự tín hiệu định vị nhân và một vùng tận cùng đầu C biến đổi [7].

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 [7]. 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 and Yamaguchi-Shinozaki (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 [5]. Trong một số nghiên cứu gần đây, gen *OsNAC5* cũng được chứng minh là có liên quan đến tính chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường. Protein *OsNAC5* định vị trong nhân và biểu hiện mạnh trong các điều kiện hạn, mặn, lạnh và xử lý ABA [10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được gen *OsNAC5* từ 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.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Giống lúa *Indica* 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 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 thế giới (mã số NM_001072451.1) và tổng hợp bởi hãng Sigma (Bảng 1).

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

Tên mỗi	Trình tự mỗi
OsNAC5- Fw	5'-GGATCCATGGAGTGCGGTGGT-3'
OsNAC5- Rv	5'-GGATTCTTAGAACGGCTTCTG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.2. 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 và cộng sự, 1982 [11].

Tổng hợp cDNA:

2,5 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 OsNAC5:

Gen *OsNAC5* 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™ Gel Extraction* của hãng Fermentas.

Nhân dòng gen OsNAC5:

Đoạn gen *OsNAC5* nhân bản bằng PCR được nhân dòng bằng bộ kit pGEMT Easy theo quy trình đi kèm của hãng Promega. Plasmid tái tổ hợp pGEMT/*OsNAC5* 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 OsNAC5:

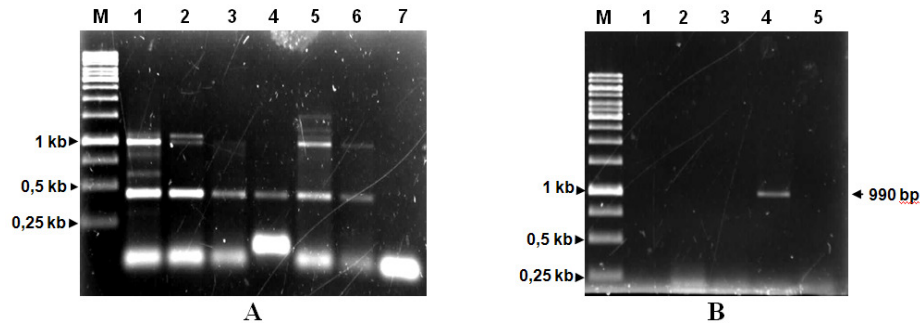
Trình tự gen được xác định bằng thiết bị tự động ABI 3100 dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger có sử dụng các

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.

3. Kết quả và thảo luận

Phân lập gen *OsNAC5* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress:

Dựa vào trình tự nucleotide của gen *OsNAC5* được công bố trên ngân hàng gen (AB028184.1), chúng tôi đã thiết kế cặp mồi *OsNAC5-F/OsNAC5-R* (Bảng 1) để sử dụng cho phản ứng PCR nhân bản đoạn gen *OsNAC5* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress. Phản ứng PCR được thực hiện 35 chu kỳ, ở các nhiệt độ gắn mồi 52°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 gắn mồi 52°C chúng tôi đã thu được băng DNA có kích thước xấp xỉ 1 kb, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *OsNAC5*, tuy nhiên trong sản phẩm của phản ứng cũng còn chứa nhiều băng DNA không đặc hiệu (Hình 1A). Khi thực hiện phản ứng PCR với nhiệt độ gắn mồi 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 tách chiết ở thân cây lúa xử lý trong dung dịch PEG 20%. Sản phẩm thu được có kích thước khoảng gần 1000 bp (giếng 4, Hình 1B), đúng với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn gen cần nhân bản là 990 bp cho thấy chúng tôi đã phân lập được đoạn gen mong muốn từ cDNA của cây lúa xử lý stress. Ngoài ra, dựa trên sự tương đồng giữa sản phẩm của các phản ứng PCR với cặp mồi gen *actin* (gen nội chuẩn) sử dụng khuôn là các mẫu cDNA này (số liệu không trình bày), chúng tôi có thể tạm thời xác định gen này biểu hiện mạnh nhất trong điều kiện hạn tại thời điểm 3 giờ sau khi tiếp xúc với điều kiện stress so với các điều kiện stress khác.



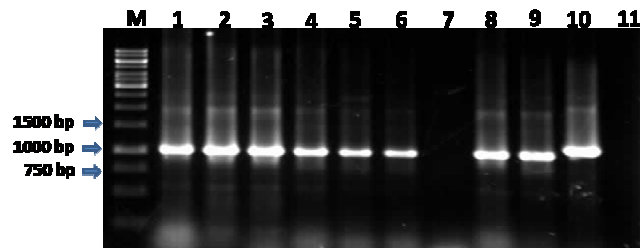
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *OsNAC5* từ cDNA của giống lúa *Indica* xử lý stress trên gel agarose 1%.

Ghi chú: **A.** Phản ứng PCR với nhiệt độ gắn mồi 52°C-40 giây, giếng M: Thang DNA chuẩn 1kb; giếng 1 – 3: cDNA tổng hợp từ RNA tách chiết ở thân, giếng 4 – 6: cDNA tổng hợp từ RNA tách chiết ở rễ, giếng 1 và 4: mẫu lúa xử lý với NaCl 200 mM, giếng 2 và 5: mẫu lúa xử lý với PEG 20%, giếng 3 và 6: mẫu lúa xử lý ở 4°C; giếng 7: đối chứng âm. **B.** Phản ứng PCR với nhiệt độ gắn mồi 56°C-20 giây, giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: mẫu lúa để khô trong không khí; giếng 3: mẫu lúa xử lý với NaCl 200 mM, giếng 4: mẫu lúa xử lý với PEG 20%, giếng 5: mẫu lúa xử lý ở 4°C.

Nhân dòng gen *OsNAC5* vào vector *pGEMT*

Sản phẩm PCR nhân bản gen *OsNAC5* từ cDNA sau khi tinh sạch bằng bộ kit *GenJET™ Gel Extraction* (Fermentas) được chúng tôi ghép nối trực tiếp với vector *pGEMT*, 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 DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 50 µg/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 *OsNAC5* trong thể biến nạp, chúng tôi chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *OsNAC5-F/OsNAC5-R*. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy phản ứng PCR từ khuôn là các khuẩn lạc số 1 – 6, 8 và 9 cho một băng DNA đặc hiệu có kích thước xấp xỉ 1kb, tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *OsNAC5* (Hình 2, giếng 1 - 6, 8 và 9). Ngược lại, ở phản ứng PCR kiểm tra khuẩn lạc số 7 hay số 10, chúng tôi không thu được băng DNA nào hay băng DNA có kích thước lớn hơn 1 kb. Kết quả này chứng tỏ các khuẩn lạc số 1 – 6, 8 và 9 là những khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp *pGEMT* chứa đoạn gen mong muốn *OsNAC5*.

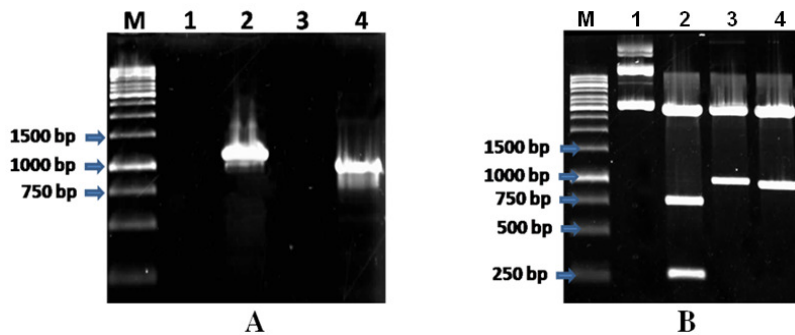


Hình 2. Kết quả PCR kiểm tra một số khuẩn lạc trắng với cặp mồi đặc hiệu.

Ghi chú: Giếng M: Thang chuẩn DNA 1kb; giếng 1 - 10: sản phẩm PCR từ khuôn là khuẩn lạc số 1 – 10; giếng 11: đối chứng âm (khuôn là H₂O).

Để khẳng định các khuẩn lạc thu được có thực sự mang plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen *OsNAC5* 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 GenJET™ Plasmid Miniprep. Sự có mặt của đoạn gen *OsNAC5* trong plasmid được chúng tôi xác định bằng phương pháp PCR và phương pháp xử lý với enzyme cắt giới hạn.



Hình 3. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp pGEMT/*OsNAC5*.

Ghi chú: **A.** Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, giếng M: Thang DNA chuẩn 1kb, giếng 1 và 3: đối chứng âm (khuôn là H₂O), giếng 2 và 4: khuôn là pGEMT/*OsNAC5*, giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi T7/SP6, giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi *OsN5-F/OsN5-R*. **B.** Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn trên gel agarose 1%, giếng M: Thang DNA chuẩn; giếng 1: vector tái tổ hợp pGEMT-*OsNAC5* nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *EcoRI/PmlI*; giếng 3: sản phẩm enzyme giới hạn *BamHI*; giếng 4: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *PstI*.

Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được chúng tôi thực hiện với 2 cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu của vector pGEMT (T7/SP6) có khoảng cách 186 bp trên vector pGEMT và cặp mồi đặc hiệu của đoạn gen *OsNAC5* (*OsNAC5-F/OsNAC5-R*). 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 3 cho thấy với cặp mồi đặc hiệu chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước khoảng 1 kb (Hình 3A, giếng 4). Sản phẩm PCR với cặp mồi vector cho một băng DNA có kích thước khoảng 1,2 kb, kích thước này phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết, bao gồm 990 bp của đoạn gen *OsNAC5* và 186 bp của vector pGEMT (Hình 3A, giếng 2).

Để khẳng định chắc chắn đoạn DNA đã được chèn vào vector pGEMT là gen *OsNAC5*, chúng tôi tiến hành thí nghiệm xử lý plasmid tái tổ hợp đã được tinh sạch từ khuẩn lạc dương

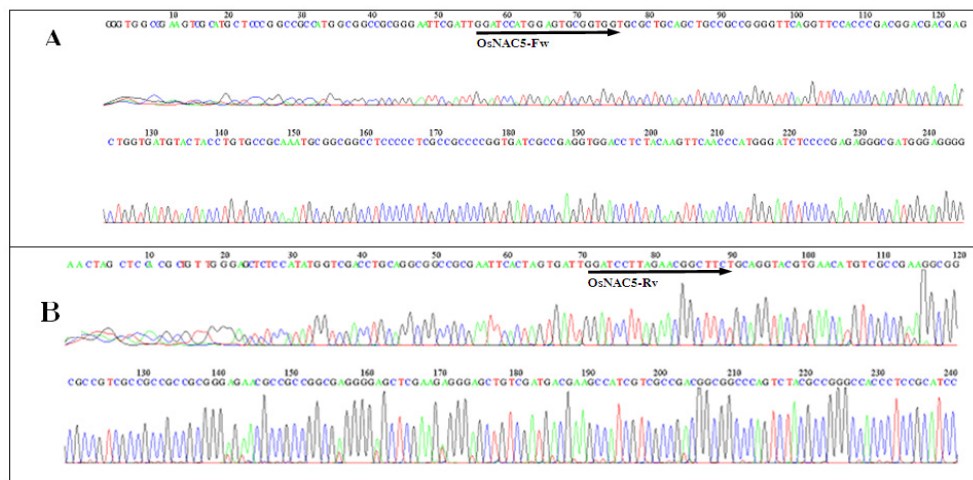
tính với các enzyme cắt giới hạn khác nhau. Trên cặp mồi đặc hiệu được dùng để nhân bản đoạn gen *OsNAC5* có thiết kế trình tự nhận biết của enzyme *BamHI* và vị trí chèn đoạn gen *OsNAC5* nằm giữa 2 vị trí nhận biết của enzyme *EcoRI* *XhoI*. Ngoài ra trong trình tự của đoạn gen *OsNAC5* có một vị trí nhận biết của enzyme *PmlI* (tại vị trí 745) và hai vị trí nhận biết của enzyme *PstI* (tại vị trí 19 và 973), trong khi trên vector pGEMT không có 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 *OsNAC5* trong vector tái tổ hợp. Kết quả thu được trên Hình 3B cho thấy sản phẩm của phản ứng cắt đồng thời bằng *EcoRI/PmlI* cho ba băng DNA, băng DNA thứ nhất có kích thước khoảng 3,0 kb là bộ khung nguyên bản của vector pGEMT, hai băng DNA còn lại chính là đoạn gen *OsNAC5* bị cắt đôi thành hai đoạn nhỏ có kích thước khoảng 750

bp và 250 bp (Hình 3B, giếng 2). Đối với phản ứng cắt giới hạn bằng *Bam*HI, chúng tôi thu được hai băng DNA, trong đó có 1 băng có kích thước xấp xỉ 1 kb là kích thước hoàn chỉnh của đoạn gen *OsNAC5* (Hình 3B, giếng 3). Đối với phản ứng cắt giới hạn bằng enzyme *Pst*I có hai vị trí nhận biết bên trong trình tự gen *OsNAC5*, chúng tôi cũng thu được chính xác băng DNA có kích thước tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết (khoảng 950 bp) (Hình 3B - giếng 4). 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 *OsNAC5* vào vector pGEMT.

Phân tích trình tự gen OsNAC5 của giống lúa Indica

Để khẳng định chính xác đoạn gen được nhân bản và nhân dòng vào vector pGEMT có

đúng là gen *OsNAC5* mong muốn hay không, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen này trong vector tái tổ hợp pGEMT/*OsNAC5* bằng hệ thống máy giải trình tự ABI 3100. Kết quả giải trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm Bioedit (Hình 4) và so sánh với trình tự gen *OsNAC5* của giống lúa *Japonica* đã được công bố trên Ngân hàng Gen thế giới (mã số NM_001072451.1). Kết quả phân tích trình tự cho thấy gen *OsNAC5* phân lập được từ giống lúa *Indica* có chiều dài 993 bp, có trình tự nucleotide tương đồng 98% so với trình tự gen *OsNAC5* đã được công bố [12]. Đoạn gen *OsNAC5* phân lập được mã hóa cho một protein dài 330 axit amin, chứa đầy đủ 5 vùng đặc trưng của họ protein NAC và một vùng tín hiệu định vị nhân phổ biến cho các nhân tố phiên mã (Hình 5) [13-15].

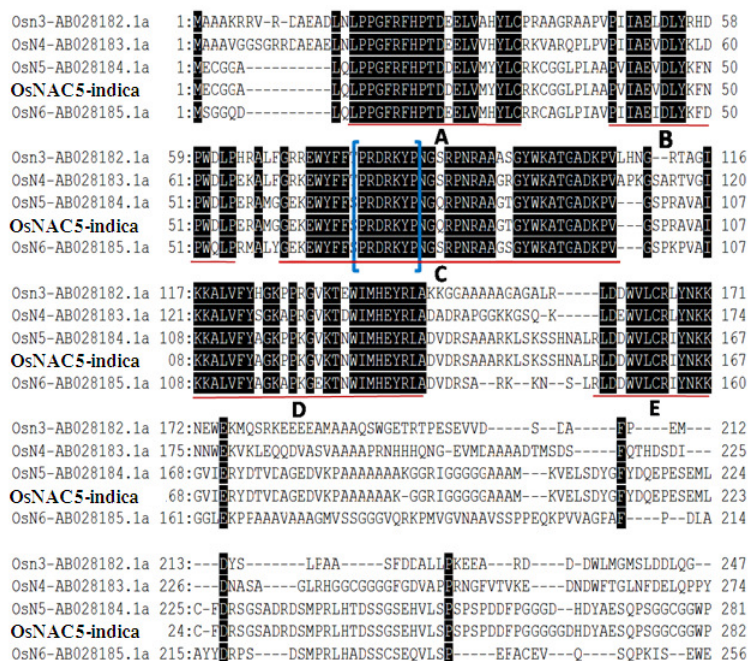


Hình 4. Một phần kết quả giải trình gen *OsNAC5*.

Ghi chú: **A.** Kết quả giải trình tự sử dụng môi T7; **B.** Kết quả giải trình tự sử dụng môi SP6.

Khi so sánh trình tự axit amin suy diễn của gen *OsNAC5* phân lập được với trình tự axit amin của protein OsNAC (của giống lúa *Japonica*) đã công bố, chúng tôi đã xác định được một đột biến mất Alanine tại vị trí 184, một đột biến thêm hai axit amin (Glycine) tại vị

trí 262 và một đột biến thay thế hai Alanine bằng hai Glycine tại vị trí 313. Tuy nhiên, tất cả các đột biến này đều nằm ở phía đầu C, không thuộc phạm vi các vùng chức năng quan trọng của protein NAC.



Hình 5. Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein OsNAC5 của giống lúa *Indica* (OsNAC5-indica) so với các protein OsNAC3, OsNAC4, OsNAC5, OsNAC6 của giống *Japonica* đã công bố trên Ngân hàng Gen thế giới Genetex 6.0.

Ghi chú: Trình tự 5 vùng peptide đặc trưng cho nhóm protein NAC được kí hiệu lần lượt là A, B, C, D, E. Đoạn peptide nằm trong ngoặc đơn là vùng tín hiệu định vị nhân. Các kí tự phía sau tên mỗi protein là mã số của protein được đăng kí trên Ngân hàng Gen thế giới.

Từ các kết quả thu được ở trên, chúng tôi có thể kết luận đã phân lập và nhân dòng thành công gen *OsNAC5* mã hoá cho nhân tố phiên mã OsNAC5 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 *OsNAC5*.

mức độ tương đồng 98% so với trình tự gen *OsNAC5* của giống lúa *Japonica* đã được công bố trên Ngân hàng gen thế giới. Sản phẩm nhân dòng gen *OsNAC5* 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.

4. 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 OsNAC5 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 *OsNAC5* của giống lúa *Indica* có

Tài liệu tham khảo

- [1] Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2007), "Gene networks involved in drought stress response and tolerance", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 2, pp. 221-227.
- [2] Souer E, Von Houwelingen A, Kloos J, Mol J and Koes R (1996), "The no apical meristem gene of petunia is requires for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries", *Cell*, 85: pp 159-170.

- [3] Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H and Tasaka M (1999), "Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: inter-action among the cup-shaped cotyledon and shoot meristemes", *Gene Development*, 126: 1563-1570.
- [4] Collinge M, và 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.
- [5] 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.
- [6] Rushton, P. J., Bokowiec, M. T., Han, S., Zhang, H., Brannock, J. F., Chen, X., et al. (2008). Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiol.* 147, 280–295. doi: 10.1104/pp.107.114041
- [7] Hu, R., Qi, G., Kong, Y., Kong, D., Gao, Q., and Zhou, G. (2010). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol.* 10:145. doi: 10.1186/1471-2229-10-145
- [8] Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A. M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., et al. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465, 30–44. doi: 10.1016/j.gene.2010.06.008
- [9] Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., et al. (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.
- [10] Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K. et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *OsNAC5* regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics.* 2010; 5:173–183.
- [11] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7.19-7.22
- [12] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [13] Ishida T, Aida M, Takada M (2000) In-volvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes om gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 41: 60-67.
- [14] Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., et al., (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal*, 426,183–196.
- [15] Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., & Chua, N.H. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development*, 14, 3024–3036.

Isolation of *OsNAC5* Gene Involved in Stress Tolerance from *Indica* Rice

Nguyễn Duy Phương, Phạm Thu Hằng, Phạm Xuân Hội

Agricultural Genetics Institute, Phạm Văn Đồng, Hà Nội, Việt Nam

Abstract: 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 isolated *OsNAC5* gene from stress-treated *Indica* rice cDNA. As a result, the length of *Indica* rice *OsNAC5* is 993 nucleotides. Sequence alignment of isolated *OsNAC5* gene and homolog GeneBank-registered *OsNAC5* (NM_001072451.1) show that they had striking homology (98%). Analysis of its deduced amino acid sequence indicated that this 330 amino acid protein contains five conserve domains and one putative nuclear localization signal at N-terminal like all well-known NAC proteins.

Keywords: Drought tolerance, *Indica* rice variety, transcription factor, *OsNAC5*, gene transformation.