

## VAI TRÒ CỦA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ *OsNLI-IF* TRONG TĂNG CƯỜNG TÍNH CHỊU HẠN Ở LÚA

Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội

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

### TÓM TẮT

Thực vật đáp ứng với các điều kiện môi trường bất lợi bằng cách hoạt hóa hàng loạt các gen liên quan tới chống chịu stress, trong đó bao gồm cả nhóm gen điều khiển mã hóa các nhân tố phiên mã. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNLI-IF* từ thư viện cDNA xử lý stress của lúa bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Nghiên cứu cho thấy *OsNLI-IF* được tăng cường biểu hiện trong các điều kiện bất lợi như hạn, mặn, lạnh, nhiệt độ cao theo con đường không phụ thuộc vào ABA. Cây thuốc lá được chuyển gen *OsNLI-IF* có tốc độ sinh trưởng chậm hơn trong điều kiện môi trường bình thường nhưng thể hiện khả năng chống chịu cao hơn rõ rệt so với cây đối chứng không chuyển gen trong điều kiện môi trường hạn. Kết quả của nghiên cứu này chứng tỏ tiềm năng ứng dụng rất lớn của gen *OsNLI-IF* trong việc phát triển các giống cây trồng chuyển gen kháng hạn.

**Từ khóa:** *chịu hạn, chuyển gen, lúa, nhân tố phiên mã, OsNLI-IF, thuốc lá.*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hạn và mặn là hai trong số những nhân tố quan trọng nhất kìm hãm sự phát triển sản xuất nông nghiệp, đặc biệt là sản xuất lúa gạo. Hiện nay, nghiên cứu tạo ra giống cây trồng chuyển gen dựa trên công nghệ tế bào thực vật đã trở nên phổ biến trên thế giới và đang dần được áp dụng ở Việt Nam. Do đó, việc nghiên cứu đặc tính các gen đáp ứng hạn và mặn cũng như việc đánh giá khả năng áp dụng của chúng là một yêu cầu hết sức cấp thiết. Trong hệ gen thực vật có rất nhiều gen đã được xác định liên quan tới đáp ứng chống chịu stress và được chia thành hai nhóm chính: (1) nhóm gen chức năng mã hóa cho các protein, enzyme tham gia trực tiếp vào quá trình đáp ứng với điều kiện bất lợi của thực vật và (2) nhóm gen điều khiển mã hóa các nhân tố phiên mã có vai trò điều khiển quá trình hoạt động của các gen chức năng [5]. Gần đây, rất nhiều nghiên cứu về nhân tố phiên mã được thực hiện trên cây mô hình *Arabidopsis* và các loài thực vật khác đã chứng minh các nhân tố phiên mã có thể kích hoạt sự biểu hiện của rất nhiều gen chức năng, từ đó giúp tăng cường khả năng chống chịu điều kiện bất lợi ở thực vật [6].

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa protein *OsNLI-IF* (Nuclear LIM interactor-interacting factor) từ thư viện cDNA xử lý stress của lúa. Nghiên cứu ban đầu cho thấy *OsNLI-IF* được cảm ứng bởi các điều kiện bất lợi của môi

trường như hạn, mặn và lạnh. Các cấu trúc biểu hiện của gen *OsNLI-IF* đã được chuyển vào cây thuốc lá mô hình để nghiên cứu chức năng của nhân tố phiên mã *OsNLI-IF*.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu

Thư viện cDNA của lúa Pusa Basmati 1 xử lý stress do phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

#### 2.2. Phương pháp

##### 2.2.1. Phân lập gen từ thư viện cDNA xử lý stress

Đoạn gen *OsNLI-IF* được nhân bản từ thư viện cDNA của lúa bằng kỹ thuật PCR [4], sử dụng mồi xuôi EcoRI-NLI-Fw (5'-GAATTCATGCCAGCACTGAGGATG-3') và mồi ngược XhoI-NLI-Rv (5'-CTCGAGTTATTGGAAAATCTCAGC-3'). Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 0,5 µl DNA khuôn; 1 µl mỗi loại mồi; 2,5 µl đệm *Taq* polymerase 10 X; 2,5 µl dNTP 2 mM; 1 µl *Taq* polymerase; 17,5 µl H<sub>2</sub>O cất khử trùng khử ion. Phản ứng được thực hiện 35 chu kỳ: biến tính DNA ở 95°C – 30 giây, gắn mồi ở 55°C – 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C – 1 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch từ gel agarose bằng bộ kit GenJET™ Gel Extraction (Fermentas) và nhân dòng vào vector pGEM-T (Promega) theo quy trình hướng dẫn đi kèm bộ kit.

### 2.2.2. Phân tích Northern blot

Thí nghiệm lai RNA được thực hiện theo mô tả trước đây của Nakashima [3]. Mảnh DNA mang trình tự đầy đủ của *OsRap2.4A* và rRNA 18S (đối chứng) được đánh dấu phóng xạ bằng [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP và sử dụng làm đầu dò cho thí nghiệm lai. RNA tổng số được điện di trên gel agarose biến tính 1.2% chứa formaldehyde-MOPS và chuyển lên màng Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences). Sau khi chuyển màng, màng được rửa hai lần trong SSC 2X chứa SDS 0,1% trong 20 phút ở 65°C và một lần trong SSC 1X chứa SDS 0,1%. RNA được phát hiện trên phim X. rRNA 18S được sử dụng làm mẫu nội chuẩn.

### 2.2.3. Lai thăm tách miễn dịch (Western blot)

Dịch chiết protein sau khi điện di trên gel SDS-PAGE theo phương pháp của Laemmli (1970) [4] được chuyển lên màng nitrocellulose bằng phương pháp điện chuyển trong đệm Tris-glycine có 20% methanol. Màng được cố định bằng dung dịch BSA 1% trước khi được ủ với kháng thể sơ cấp và thứ cấp. Băng protein được hiện màu bằng cách ủ màng trong dung dịch cơ chất p-nitro blue tetrazolium chloridyl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (NBT/BCIP) pha trong đệm TBS pH 9,0 có MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

### 2.2.4. Thiết kế vector biểu hiện trong tế bào thực vật và tạo cây chuyển gen

Để thiết kế hệ vector biểu hiện pCAMBIA1301, vector tách dòng pGEM/OsNLI-IF và “vector cho” pRT101 được xử lý đồng thời bằng *EcoRI*. Trình tự mã hóa NLI-IF được ghép nối vào “vector cho” pRT101 để tạo cấu trúc biểu hiện gen [*35S:OsNLI-IF:NOS*]. Cấu trúc [*35S:OsNLI-IF:NOS*] được chèn vào vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *HindIII* của vector chuyển gen pCAMBIA1301. Các cấu trúc biểu hiện gen *OsNLI-IF* được chuyển vào cây thuốc lá theo phương pháp của Horsch *et al.*, sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens* LBA4404 [2].

### 2.2.5. Đánh giá khả năng chống chịu hạn

Thí nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của cây chuyển gen được thực hiện theo phương pháp của Dubouzet [1]. Hạt thuốc lá được cho nảy mầm trên môi trường MS không

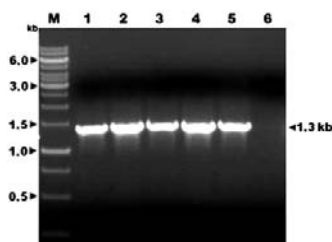
có chất kháng sinh (đối với cây đối chứng không chuyển gen) và có chứa Hygromycin 50 mg/l (đối với cây chuyển gen). Cây non ở giai đoạn 2 lá non được chuyển sang chậu đất và trồng trong điều kiện nhà kính trong 2 tuần. Các mẫu cây được xử lý stress hạn giả định bằng cách ngừng tưới nước trong 1 tháng, sau đó tưới nước trở lại bình thường. Sau 2 tuần, số cây phục hồi sinh trưởng được đếm và ghi lại.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập nhân tố phiên mã OsNLI-IF từ thư viện cDNA xử lý stress

Để phục vụ cho việc nghiên cứu chức năng của OsNLI-IF trong cây lúa, thí nghiệm nhân dòng *OsNLI-IF* vào pGEM-T đã được thực hiện. Cặp mồi đặc hiệu *EcoRI*-NLI-Fw/*XhoI*-NLI-Rv để nhân bản vùng ORF của *OsNLI-IF* từ thư viện cDNA thứ cấp pAD-GAL4 đã được thiết kế dựa trên trình tự gen *OsNLI-IF* được công bố trên GenBank (mã số NM\_001050330.1).

Đoạn gen *OsNLI-IF* được nhân bản bằng PCR. Kết quả ảnh điện di sản phẩm PCR cho thấy tất cả sản phẩm PCR sử dụng khuôn là thư viện cDNA đều chứa 1 băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1,3 kb (Hình 1, giếng 1-5) tương ứng với kích thước theo lý thuyết của gen *OsNLI-IF*; trong khi phản ứng đối chứng âm không có DNA khuôn, chúng tôi không thu được băng DNA này (Hình 1, giếng 6).



Hình 1: Nhân bản đoạn gen *OsNLI-IF* bằng kỹ thuật PCR

**Ghi chú:** Sản phẩm PCR với cặp mồi *EcoRI*-NLI-Fw/*XhoI*-NLI-Rv được điện di trên gel agarose 1%. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb; giếng 1 – 5: khuôn là thư viện cDNA pha loãng tỉ lệ 1:1, 1:10, 1:50, 1:100 và 1:500; giếng 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn).

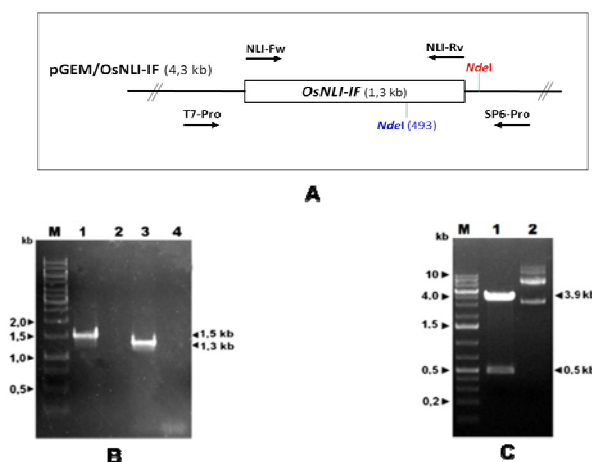
Sản phẩm nhân bản đoạn gen *OsNLI-IF* được tinh sạch (nhằm loại bỏ toàn bộ các thành

phần dư thừa của PCR và các băng DNA không đặc hiệu khác), sau đó ghép nối vào vector nhân dòng pGEM-T. Vector tái tổ hợp sau đó được kiểm tra bằng hai phương pháp PCR và cắt enzyme giới hạn.

Kết quả điện di trên hình 2A cho thấy đối với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của *OsNLI-IF* (EcoRI-NLI-Fw/XhoI-NLI-Rv), sản phẩm PCR cho một băng DNA có kích thước khoảng 1,3 kb (hình 2B, giếng 3) tương ứng với kích thước của đoạn gen đích. Đối với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vector (T7-Pro/SP6-Pro), kết quả điện di thu được một băng DNA khoảng 1,5 kb (hình 2B, giếng 1); kích thước này phù hợp với kích thước

đoạn DNA theo tính toán lý thuyết bao gồm 1,3 kb chiều dài *OsNLI-IF* và 186 bp của đoạn DNA nằm trên vector pGEM (hình 2A).

Đối với thí nghiệm kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn, do trên vector pGEM-T và đoạn gen *OsNLI-IF* đều có 1 vị trí nhận biết của enzyme *NdeI* (hình 2A) nên chúng tôi đã thực hiện phản ứng cắt giới hạn pGEM/Hox24 bằng *NdeI* để xác định sự có mặt của *OsNLI-IF* trong vector tái tổ hợp. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn cho thấy sự xuất hiện của hai băng DNA có kích thước đúng với kích thước tính toán lý thuyết (hình 2C, giếng 1) chứng tỏ plasmid thu được là vector tái tổ hợp pGEM/*OsNLI-IF*.



Hình 2: Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/*OsNLI-IF* bằng PCR và cắt giới hạn

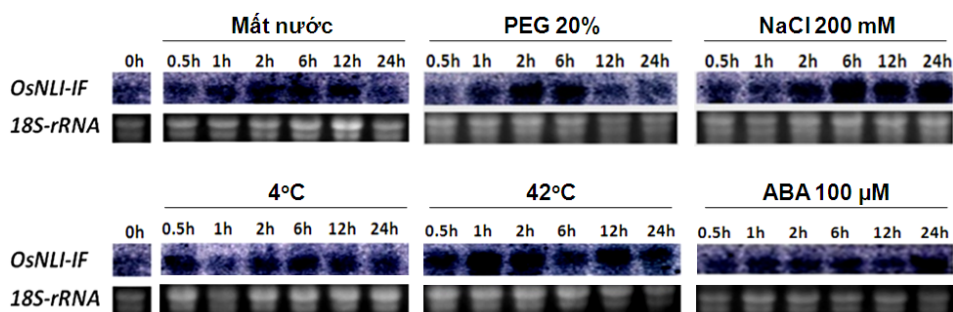
**Ghi chú:** (A) Sơ đồ vị trí nhận biết của mồi và enzyme cắt giới hạn trên vector pGEM/*OsNLI-IF*. Sản phẩm PCR và cắt giới hạn được điện di trên gel agarose 1%. (B) PCR plasmid tái tổ hợp; giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi T7-Pro/SP6-Pro; giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi EcoRI-NLI-Fw/XhoI-NLI-Rv; giếng 1 và 3: khuôn là pGEM/*OsNLI-IF*; giếng 2 và 4: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (C) Cắt giới hạn plasmid tái tổ hợp bằng *NdeI*; giếng 1: sản phẩm cắt giới hạn; giếng 2: plasmid nguyên bản. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb.

Để khẳng định chính xác đoạn DNA được nhân bản và nhân dòng vào vector pGEM-T đúng là đoạn gen mã hoá protein *OsNLI-IF*, chúng tôi tiến hành giải trình tự vector tái tổ hợp pGEM/*OsNLI-IF* và phân tích kết quả bằng phần mềm BioEdit. Kết quả so sánh trình tự nucleotide cho thấy đoạn DNA đã nhân dòng có kích thước 1320 bp, mang trình tự mã hóa một chuỗi polypeptide gồm 439 acid amin, tương đồng với trình tự DNA có mã số NM\_001050330.1 trong GenBank và được đặt tên là *OsNLI-IF*. Các kết quả thu được chứng tỏ khung đọc mở của gen mã hoá protein

*OsNLI-IF* đã được nhân dòng thành công.

### 3.2. Nghiên cứu biểu hiện của *OsNLI-IF*

Để xác định mô hình biểu hiện của *OsNLI-IF* trong các điều kiện stress phi sinh học, cây lúa non ba tuần tuổi xử lý với các điều kiện stress giả định (nhân tạo), sau đó mẫu RNA tổng số của các mẫu lúa đã xử lý stress trong khoảng thời gian khác nhau được tách chiết và sử dụng cho các thí nghiệm phân tích hàm lượng mRNA. Mẫu RNA tách chiết từ cây lúa ở thời điểm chưa xử lý stress được sử dụng làm mẫu đối chứng âm.



Hình 3: Mức độ tích lũy mRNA *OsNLI-IF* trong cây lúa xử lý stress.

**Ghi chú:** Cây lúa được xử lý stress bằng cách để khô trong không khí (mất nước), hạn (PEG 20%), mặn (NaCl 200 mM), lạnh (4°C), nóng (42°C) và hormone (ABA 100 μM) trong thời gian 0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h và 24 h. mRNA của *OsNLI-IF* được phát hiện bằng kỹ thuật Northern blot, sử dụng đầu dò (sản phẩm PCR nhân bản *OsNLI-IF*) có gắn phóng xạ P<sup>32</sup>. Mẫu tách chiết rRNA 18S được điện di trên gel agarose biến tính và nhuộm EtBr làm đối chứng.

Kết quả phân tích hàm lượng mRNA bằng kỹ thuật Northern blot cho thấy hàm lượng mRNA của *OsNLI-IF* thay đổi rõ rệt theo thời gian trong thí nghiệm xử lý stress. Mức độ biểu hiện cao nhất của *OsNLI-IF* quan sát được ở thời điểm 12 giờ trong thí nghiệm xử lý stress mặn, thể hiện ở hàm lượng mRNA tăng khoảng 68 lần so với bình thường. Hàm lượng mRNA của *OsNLI-IF* tăng đáng kể trong vòng 2 giờ sau khi tiếp xúc với stress lạnh và mặn (tăng khoảng 20 lần), đạt đỉnh sau 6 – 12 giờ xử lý stress. Trong thí nghiệm xử lý điều kiện mất nước, mức độ phiên mã của *OsNLI-IF* tăng chậm hơn nhưng đạt đỉnh khá sớm ở thời điểm 2 giờ (tăng ~30 lần), sau đó bắt đầu giảm dần. Đối với thí nghiệm xử lý nhiệt độ 42°C, chúng tôi phát hiện hàm lượng mRNA của *OsNLI-IF* thay đổi rất nhanh, tăng hơn 40 lần chỉ trong thời gian 30 phút, sau đó bắt đầu giảm dần. Tuy nhiên, đến thời điểm 6 giờ sau khi xử lý stress, *OsNLI-IF* dường như tăng biểu hiện trở lại và đạt gần tới mức biểu hiện cao nhất (thời điểm 0,5 giờ) sau 12 giờ. Mức độ tích lũy mRNA của *OsNLI-IF* trong điều kiện hạn và lạnh xảy ra chậm hơn so với trong điều kiện stress nhiệt độ cao và đều đạt đỉnh ở thời điểm 6 giờ sau khi xử lý stress. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của *OsNLI-IF* trong điều kiện stress hạn giảm rất nhanh về gần mức cơ bản sau 12 giờ xử lý stress. Ngược lại, trong các thí nghiệm xử lý stress lạnh, mất nước và đặc biệt là stress mặn, *OsNLI-IF* vẫn duy trì mức độ biểu hiện cao sau 24 giờ tiếp xúc với yếu tố stress. Đối với thí nghiệm xử lý cây lúa non bằng hormone ABA, chúng tôi không phát hiện được sự thay đổi đáng kể nào về hàm lượng mRNA

trong hầu hết thời gian thí nghiệm. Các kết quả thu được này chứng tỏ quá trình phiên mã của *OsNLI-IF* được điều hòa bởi nhiều yếu tố stress phi sinh học khác nhau, bao gồm stress mặn, hạn, mất nước, lạnh và nhiệt độ cao.

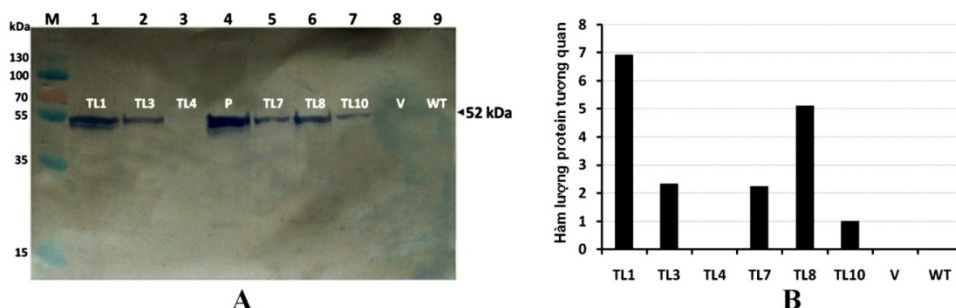
### 3.3. Biểu hiện của *OsNLI-IF* trong cây thuốc lá chuyển gen

Trong nghiên cứu này, để xác định chức năng của nhân tố phiên mã OsNLI-IF trong điều kiện *in vivo*, chúng tôi tiến hành thí nghiệm chuyển cấu trúc 35S:*OsNLI-IF* vào cây thuốc lá. Các dòng cây chuyển gen (T<sub>0</sub> và T<sub>1</sub>) được kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu của cấu trúc biểu hiện gen đích (số liệu không trình bày). Sự có mặt của protein OsNLI-IF trong các dòng thuốc lá chuyển gen T<sub>1</sub> được phát hiện bằng kỹ thuật lai thẩm tách miễn dịch với kháng thể kháng đặc hiệu OsNLI-IF.

Kết quả lai thẩm tách miễn dịch cho thấy có 5 trong số 6 dòng thuốc lá chuyển gen được kiểm tra (TL1, TL3, TL7, TL8 và TL10) có biểu hiện protein đích với sự xuất hiện của 1 băng protein 52 kDa (Hình 4A, giếng 1, 2, 5, 6, và 7) tương tự mẫu đối chứng dương sử dụng protein OsNLI-IF tái tổ hợp (Hình 4A, giếng 4). Ngược lại, cả 3 cây T<sub>1</sub> thuộc dòng TL4 và 3 cây thuộc hai dòng đối chứng (chuyển cấu trúc pCAMBIA1301 và không chuyển gen) đều cho kết quả âm tính. Sử dụng phần mềm ImageJ, mức độ biểu hiện protein OsNLI-IF tương quan giữa các dòng thuốc lá chuyển gen đã được xác định (Hình 4B). Kết quả so sánh cho thấy mức

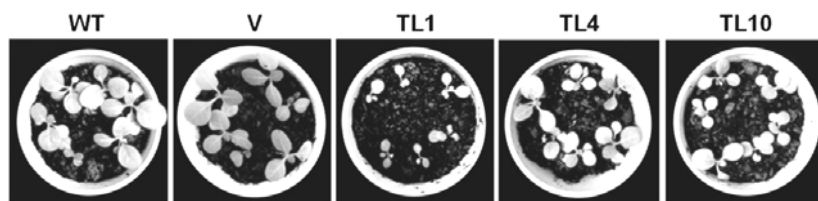
độ biểu hiện của gen đích *OsNLI-IF* có sự khác biệt đáng kể giữa các dòng thuốc lá chuyển gen. Cụ thể, hàm lượng protein OsNLI-IF cao nhất được phát hiện trong các cây thuộc hai dòng TL1 và TL8; hai dòng TL3 và TL7 có

mức độ biểu hiện protein đích ở mức vừa phải; dòng TL10 có mức độ tích lũy OsNLI-IF thấp nhất; dòng TL4 hoàn toàn không biểu hiện protein đích.



Hình 4: Biểu hiện của *OsNLI-IF* trong các dòng thuốc lá chuyển gen  $T_1$

**Ghi chú:** (A) Protein *OsNLI-IF* trong dịch chiết protein tổng số của các dòng thuốc lá được phát hiện bằng kháng thể đa dòng đặc hiệu (pha loãng 1:2000); giếng M: thang chuẩn protein; giếng 1 – 3 và 5 – 7: dòng TL1, TL3, TL4, TL7, TL8, TL10; giếng 4: *OsNLI-IF* tái tổ hợp (P); giếng 8: dòng ĐC8 (V); giếng 9: cây thuốc lá không chuyển gen (WT). (B) Đồ thị so sánh hàm lượng protein *OsNLI-IF* tương quan giữa các dòng thuốc lá; hàm lượng *OsNLI-IF* của dòng TL10 có giá trị bằng 1; giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm trên 3 cây khác nhau.



Hình 5: Khả năng sinh trưởng của các dòng thuốc lá chuyển gen  $T_1$

**Ghi chú:** Hình thái của các dòng thuốc lá sinh trưởng ở giai đoạn 4 tuần tuổi. (WT) cây thuốc lá dại; (V) dòng thuốc lá mang cấu trúc pCAMBIA1301; (TL1, TL4, TL10) dòng thuốc lá mang cấu trúc 35S:*OsNLI-IF*:Nos.

Để xác định ảnh hưởng của sự biểu hiện liên tục gen mã hóa *OsNLI-IF* đối với khả năng sinh trưởng của cây thuốc lá chuyển gen, hạt của 3 dòng thuốc lá đại diện cho 3 mức độ biểu hiện gen khác nhau (TL1 – biểu hiện cao, TL10 – biểu hiện thấp và TL4 – không biểu hiện) đã được lựa chọn để tiếp tục phân tích, đánh giá kiểu hình. Kết quả quan sát các cây thuốc lá ở giai đoạn 4 tuần tuổi cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về hình thái và tốc độ sinh trưởng giữa cây thuốc lá đối chứng không chuyển gen (Hình 5, dòng WT) và cây thuốc lá được chuyển cấu trúc không mang gen đích pCAMBIA1301 (Hình 5, dòng V). Điều này chứng tỏ việc chuyển cấu trúc biểu hiện gen trên vector pCAMBIA1301 vào cây thuốc lá không gây ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng

của cây. Đối với ba dòng thuốc lá được chuyển cấu trúc biểu hiện gen *OsNLI-IF*, mặc dù hình thái cây không xuất hiện những đặc điểm bất thường, tốc độ sinh trưởng của ba dòng cây chuyển gen này có sự khác biệt đáng kể khi được so sánh với nhau và với hai dòng thuốc lá đối chứng. Quan sát này cho thấy tốc độ sinh trưởng của cây chuyển gen tỉ lệ nghịch với mức độ biểu hiện của gen *OsNLI-IF*. Cụ thể, dòng thuốc lá tích lũy protein *OsNLI-IF* ở mức cao nhất (dòng TL1) có tốc độ sinh trưởng chậm nhất, dòng thuốc lá biểu hiện protein *OsNLI-IF* ở mức thấp (dòng TL10) hoặc không biểu hiện protein *OsNLI-IF* (dòng TL4) có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn và không khác biệt lớn so với hai dòng đối chứng (Hình 5, dòng TL1, TL4 và TL10). Kết quả này chứng tỏ sự

biểu hiện của gen *OsNLI-IF* đã gây ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng của cây thuốc lá chuyển gen và mức độ tích lũy protein OsNLI-IF trong mô càng cao sẽ dẫn tới cây sinh trưởng càng chậm trong điều kiện gieo trồng bình thường (không có stress).

Để đánh giá khả năng chống chịu hạn của cây thuốc lá chuyển gen biểu hiện tăng cường protein OsNLI-IF của lúa, các cây thuốc lá chuyển gen T<sub>1</sub> được chúng tôi trồng trong điều kiện stress hạn giả định (không tưới nước) trong một tháng, sau đó tưới nước trở lại và quan sát khả năng phục hồi. Kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy dòng thuốc lá TL10 biểu hiện

protein đích OsNLI-IF ở mức độ thấp có khả năng chống chịu hạn cao nhất với tỉ lệ cây phục hồi sau stress hạn chiếm 75% tổng số cây được kiểm tra. Khả năng chịu hạn của dòng thuốc lá TL1 (có gen *OsNLI-IF* biểu hiện mạnh) thấp hơn so với dòng thuốc lá TL10, với 20/36 cây phục hồi sau thí nghiệm xử lý hạn (56%). Đặc biệt, tỉ lệ sống sót của các cây thuốc lá có biểu hiện protein OsNLI-IF cao hơn rõ rệt so với dòng đối chứng không chuyển gen (16%) cũng như dòng ĐC2 được chuyển cấu trúc pCAMBIA1301 không mang gen (8%) hay dòng TL4 được chuyển cấu trúc 35S:*OsNLI-IF* nhưng không biểu hiện gen đích (8%).

Bảng 2: Tỉ lệ phục hồi sau xử lý stress hạn các dòng thuốc lá

Dòng thuốc lá	Cấu trúc biểu hiện gen	Tỉ lệ cây sống sót	
		Tưới nước <sup>1</sup>	Không tưới nước <sup>2</sup>
Đối chứng	Không chuyển gen	35/35 (100%)	6/36 (16%)
ĐC2	pCAMBIA1301	36/36 (100%)	3/36 (8%)
TL1	35S: <i>OsNLI-IF</i>	35/36 (97%)	20/36 (56%)
TL4	35S: <i>OsNLI-IF</i>	36/36 (100%)	8/36 (22%)
TL10	35S: <i>OsNLI-IF</i>	36/36 (100%)	27/36 (75%)

<sup>(1)</sup> Cây thuốc lá được trồng trong chậu đất và tưới nước hàng ngày.

<sup>(2)</sup> Cây thuốc lá được trồng trong chậu đất và không tưới nước liên tục trong 1 tháng, sau đó tưới nước trở lại liên tục trong 3 ngày.

#### IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp PCR chúng tôi đã phân lập thành công gen mã hóa nhân tố phiên mã OsNLI-IF từ thư viện cDNA xử lý stress của lúa. Đoạn gen phân lập được có kích thước 1320 bp mã hóa cho chuỗi polypeptide gồm 439 acid amin, tương đồng 100% với trình tự có mã số NM\_001050330.1 trên GenBank. Gen *OsNLI-IF* cảm ứng biểu hiện với các yếu tố môi trường bất lợi bao gồm hạn, mặn, lạnh và nhiệt độ cao theo con đường điều hòa không phụ thuộc ABA. Các dòng thuốc lá chuyển gen *OsNLI-IF* có tốc độ sinh trưởng chậm hơn so với các dòng cây đối chứng trong điều kiện bình thường; trong thí nghiệm xử lý stress hạn (ngừng tưới nước), cây chuyển gen thể hiện khả năng chống chịu cao hơn rõ rệt so với cây

đối chứng, tỉ lệ cây chuyển gen sống sót đạt 22 – 75% so với 8 – 16% của cây đối chứng.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn: Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia đã cấp kinh phí thực hiện nghiên cứu theo đề tài “Nghiên cứu chức năng của các gen mã hóa nhân tố phiên mã biểu hiện trong điều kiện hạn, mặn ở lúa” năm 2012; Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật di truyền và Công nghệ sinh học New Delhi, Ấn Độ (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India) đã hợp tác về mặt khoa học; Viện Di truyền Nông nghiệp đã tạo điều kiện thuận lợi để thực hiện đề tài.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2003), *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, 33(4): 751-763.
2. Horsch R. B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229–1231.
3. Nakashima K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2002), *Molecular Methods of Plant Analysis: Testing for Genetic Manipulation in Plants*, Berlin: Springer-Verlag, 22: 37-61.
4. Sambrook J. and Russel D.W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
5. Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 58: 221-227.
6. Todaka D., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Plant Sci.*, 6:84. DOI: 10.3389/fpls.2015.00084.

## ABSTRACT

### Transcription factor OsNLI-IF relating to drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)

Plants adapt to unfavorable environments via activating various genes relating to stress including genes encoded transcription factors (protein TFs). In the study, rice genes encoding transcription factor OsNLI-IF were examined from cDNA library under stress treatments. PCR was analyzed with specific primers. Accordingly, *OsNLI-IF* was enhanced and well expressed under drought, salinity, cold, heat through ABA-independent pathway. Transgenic tobacco with *OsNLI-IF* exhibited its slow growth as compared to wild type under normal condition, but more tolerant than wild type under drought stress. The result clarified great potential of *OsNLI-IF* in rice improvement of drought tolerance.

**Keywords:** drought tolerance, *OsNLI-IF*, tobacco, transcription factor, transgenic rice.

Người phản biện: TS. Khuất Hữu Trung