

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ**

**NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU TẠO DÒNG CÂY ĐẬU TƯƠNG
CHUYỂN GEN *GmDREB6* CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CAO**

Mã số: B2017-TNA-38

Chủ nhiệm đề tài: GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên, tháng 7 năm 2019

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ**

**NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU TẠO DÒNG CÂY ĐẬU TƯỜNG
CHUYỂN GEN *GmDREB6* CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CAO**

Mã số: B2017-TNA-38

Xác nhận của cơ quan chủ trì

Chủ nhiệm đề tài

GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên, tháng 7 năm 2019

DANH SÁCH NHỮNG THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI VÀ ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH

1. Thành viên tham gia nghiên cứu đề tài và đơn vị phối hợp chính

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn
1	TS. Vũ Thị Thu Thủy	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Di truyền học
2	TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Sinh lý học thực vật
3	TS. Nguyễn Thị Hải Yến	- Trường Đại học Khoa học- ĐH Thái Nguyên; - Di truyền học
4	CN. Trần Thị Hồng	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Công nghệ sinh học
5	Nghiên cứu sinh, học viên cao học	- Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên; - Chuyên ngành Di truyền học, Sinh học thực nghiệm

2. Đơn vị phối hợp chính

Tên đơn vị trong và ngoài nước	Nội dung phối hợp nghiên cứu	Họ và tên người đại diện đơn vị
Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học	Giải trình tự gen và phân tích lai Southern, Western	PGS.TS. Lê Văn Sơn

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Danh sách những thành viên tham gia nghiên cứu đề tài và đơn vị phối hợp	i
Mục lục.....	ii
Danh mục bảng.....	iv
Danh mục hình.....	v
Danh mục ký hiệu, từ và chữ viết tắt.....	vii
Thông tin kết quả nghiên cứu	viii
Information on research results	xii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu.....	1
2. Những đóng góp khoa học của đề tài.....	3
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	3
Chương 1. MỤC TIÊU, NỘI DUNG, ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI, CÁCH TIẾP CẬN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	5
1.1. Mục tiêu nghiên cứu và nội dung nghiên cứu.....	5
1.1.1. Mục tiêu nghiên cứu.....	5
1.1.2. Nội dung nghiên cứu.....	5
1.2. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.....	6
1.2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	6
1.2.2. Vật liệu thực vật.....	7
1.2.3. Các chủng vi khuẩn và các loại vector.....	7
1.2.4. Thiết kế, tổng hợp gen <i>GmDREB6</i> và các cặp mồi PCR.....	7
1.2.5. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu.....	7
1.3. Phạm vi và địa điểm nghiên cứu.....	8
1.3.1. Phạm vi nghiên cứu.....	8
1.3.2. Địa điểm nghiên cứu.....	9
1.4. Cách tiếp cận và phương pháp nghiên cứu.....	9
1.4.1. Cách tiếp cận nghiên cứu.....	9
1.4.2. Phương pháp nghiên cứu	9

Chương 2. NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	18
2.1. Tổng quan tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài.....	18
2.1.1. Cơ chế chịu hạn của thực vật	18
2.1.2. Họ nhân tố phiên mã AP2 và phân họ DREB.....	20
2.1.3. Ứng dụng tiến bộ kỹ thuật trong chuyển gen ở cây đậu tương.....	22
2.1.4. Nghiên cứu biểu hiện nhân tố phiên mã <i>GmDREB</i>	28
2.1.5. Tình hình nghiên cứu tạo cây đậu tương biến đổi gen ở Việt Nam.....	30
2.2. Kết quả và thảo luận	31
2.2.1. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa nhân tố phiên mã <i>GmDREB6</i>	31
2.2.2. Phân tích hoạt động của vector chuyển gen <i>pBII21_GmDREB6</i> trên cây thuốc lá.....	44
2.2.3. Kết quả chuyển gen <i>GmDREB6</i> vào đậu tương và tạo cây chuyển gen	47
2.2.4. Phân tích biểu hiện của gen chuyển ở các dòng đậu tương chuyển gen	49
2.2.5. Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển <i>GmDREB6</i>	52
2.2.6. Thảo luận.....	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	58
1. Kết luận	58
2. Đề nghị.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	59
THUYẾT MINH, HỢP ĐỒNG THỰC HIỆN ĐỀ TÀI VÀ VĂN BẢN ĐIỀU CHỈNH ĐÃ ĐƯỢC PHÊ DUYỆT.....	67

DANH MỤC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.....	8
Bảng 1.2. Thành phần các môi trường trong tái sinh cây đậu tương.....	13
Bảng 1.3. Thành phần phản ứng cắt DNA tổng số bằng <i>SaII</i>	15
Bảng 2.1. Các vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự mang mã số EF551166, NM_001248412.2.....	38
Bảng 2.2. Các vị trí sai khác trong trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và suy diễn từ trình tự mang mã số EF551166, NM_001248412.2.....	40
Bảng 2.3. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen <i>GmDREB6</i> qua nách lá mầm đậu tương nhờ vi khuẩn <i>A. Tumefaciens</i>	49
Bảng 2.4. Hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T2 và các cây không chuyển gen sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl....	55

DANH MỤC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.....	10
Hình 2.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmDREB6</i> (cDNA) từ mRNA của giống đậu tương DT2008. M: Thang DNA 1 kb; 1, 2, 3: gen <i>GmDREB6</i>	32
Hình 2.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>GmDREB6</i> từ 5 dòng khuẩn lạc màu trắng.....	33
Hình 2.3. Kết quả phân tích BLAST gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008.....	34
Hình 2.4. Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008.....	35
Hình 2.5. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự gen <i>GmDREB6</i> mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank.....	37
Hình 2.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và của trình tự gen DREB6 mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank.....	39
Hình 2.7. So sánh trình tự amino acid của vùng AP2 trong protein suy diễn từ gen <i>GmDREB6</i> của giống đậu tương DT2008 và EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank.....	40
Hình 2.8. Trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> nhân tạo. Ở đầu 5'-gctctaga là trình tự chứa vị trí cắt của <i>XbaI</i> và ở đầu gagctcg-3' là trình tự chứa vị trí cắt của <i>SacI</i>	41
Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen <i>pBI121_GmDREB6</i>	42
Hình 2.10. A- Gel điện di của sản phẩm cắt từ vector <i>pPU18_GmDREB6</i> và <i>pBI121_GUS</i> với cặp enzyme <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> . B- Gel điện di của sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc <i>E.coli</i> DH5 α để kiểm tra gen <i>GmDREB6</i> trong cấu trúc <i>pBI121_GmDREB</i>	43
Hình 2.11. Hình ảnh điện di kiểm tra gen chuyển <i>GmDREB6</i> bằng colony-	

PCR từ các khuẩn lạc <i>A.tumefaciens</i> AGL1.....	43
Hình 2.12. Hình ảnh mô tả tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua lây nhiễm <i>A.tumefaciens</i> tái tổ hợp vào các mảnh lá thuốc lá.....	45
Hình 2.13. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển <i>GmDREB6</i> từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.....	45
2.14. Hình ảnh kết quả phân tích Southern blot kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển <i>GmDREB6</i> vào hệ gen các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.....	46
Hình 2.15. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cDNA của gen chuyển <i>GmDREB6</i> từ mRNA của các cây chuyển gen T0.....	47
Hình 2.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh <i>in vitro</i> và tạo cây đậu tương chuyển gen	48
Hình 2.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác nhận sự có mặt của gen chuyển <i>GmDREB6</i> trong các cây đậu tương chuyển gen T0.....	50
Hình 2.18. Hình ảnh kết quả Southern blot xác nhận sự hợp nhất của gen chuyển <i>GmDREB6</i> vào hệ gen của cây đậu tương chuyển gen T0.....	51
Hình 2.19. Kết quả phân tích Western blot xác nhận protein DREB6 tái tổ hợp biểu hiện trong các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1.....	52
Hình 2.20. Biểu đồ so sánh mức độ biểu hiện của gen <i>GmP5CS</i> phản ứng với stress muối trong bốn dòng cây đậu tương chuyển gen <i>GmDREB6</i> ở T2 và cây không chuyển gen được xác định bằng Real time RT-PCR.....	53
Hình 2.21. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật.....	56

DANH MỤC KÝ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABA	Abcisic Acid	
AS	Acetylseringone	
bp	base pairs	Cặp bazơ nitơ
cs		Cộng sự
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	
ETDA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	
GM	Germination Medium	Môi trường nảy mầm
IPTG	IsoPropylThio- β -Galactoside	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
OD	Optical Density	Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
rGmCHI	Recombinant GmCHI protein	Protein tái tổ hợp GmCHI
RM	Rooting Medium	Môi trường tạo rễ
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase- phiên mã ngược
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
Ti-plasmid	Tumor inducing - plasmid	Plasmid gây khối u
TMB	3,3',5,5'-TetraMethyl Benzidine	
T0, T1, T2		Các thế hệ cây chuyển gen
T0		Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm
T1		Hạt của cây chuyển gen T0 nảy mầm thành cây T1
T2		Hạt của cây chuyển gen T1 nảy mầm thành cây T2
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- galacto-pyranoside	
GmDREB6	<i>Glycine max</i> dehydration responsive element binding protein 6	

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung

- Tên đề tài: Nghiên cứu bước đầu tạo dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* có khả năng chịu hạn cao
- Mã số: B2017-TNA-38
- Chủ nhiệm đề tài: GS.TS. Chu Hoàng Mậu
- Tổ chức chủ trì: Đại học Thái Nguyên
- Thời gian thực hiện: 30 tháng.

2. Mục tiêu

- i) Phân tích được hoạt động và chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6* trên cây mô hình;
- ii) Tạo được dòng cây chuyển gen có khả năng chịu hạn cao hơn cây đối chứng bằng kỹ thuật chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6*.

3. Tính mới và sáng tạo

- 1) Đã phân lập được đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* (cDNA) từ giống đậu tương DT2008 với kích thước là 693 bp mã hóa 230 amino acid. Thiết kế thành công vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* chứa trình tự gen *GmDREB6* nhân tạo. Gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen và hoạt động tốt trong cây thuốc lá.
- 2) Đã tạo được 10 cây đậu tương chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới. Đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* được di truyền từ thế hệ T0 sang thế hệ T1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp DREB6.
- 3) Đã chứng minh được sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmDREB6* đã làm tăng hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* và cải thiện sự tích lũy proline trong cây chuyển gen.
- 4) Tạo được 4 dòng chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 ở thế hệ T2 có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy amino acid proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen.

4. Kết quả nghiên cứu

1.1. Trình tự đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 có kích thước 693 bp mã hóa 230 amino acid. Vector chuyển gen *pBII21_GmDREB6* chứa trình tự gen *GmDREB6* nhân tạo được thiết kế thành công và tạo được vi khuẩn *Agrobacterium* tái tổ hợp mang cấu trúc gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB6 của cây đậu tương.

1.2. Bằng kết quả phân tích Southern blot và RT-PCR đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen và hoạt động tốt trong cây thuốc lá.

1.3. Cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* được biến nạp thành công vào cây đậu tương và từ 450 mẫu biến nạp, qua 3 lần chọn lọc bằng kháng sinh kanamicin, kết quả đã tạo được 10 cây đậu tương chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới.

1.4. Gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen cây đậu tương T0 được xác nhận bằng kết quả phân tích Southern blot. Đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* được di truyền từ thế hệ T0 sang thế hệ T1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp DREB6.

1.5. Sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmDREB6* làm tăng hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* và cải thiện sự tích lũy proline trong cây chuyển gen. Tạo được 4 dòng chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 ở thế hệ T2 có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy amino acid proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen.

5. Sản phẩm

5.1. Sản phẩm khoa học

1. Thi Ngọc Lan Nguyen, Phutthakone Vaciaya, Thi Mai Thu Lo, Thi Hai Yen Nguyen, Thi Thanh Nhan Pham, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2019), “Design of Construct Carrying GmDREB6 to Enhance Soybean Gene Expression Related to Abiotic Stress Response”, *JERS, European Journal of Engineering Research and Science* 4(6), pp. 135-139.
2. Lò Thị Mai Thu, Nguyễn Việt Nga, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu (2018), “Đặc điểm của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương chịu hạn

DT2008”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên* 187(11), tr.163-168.

3. Phạm Thị Thanh Nhân, Phạm Minh Hào, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu (2018), “Nghiên cứu chuyển gen *GmDREB* vào giống đậu tương ĐT12”, *Tạp chí Khoa học-Công nghệ, Đại học Thái Nguyên* 180(04), tr. 81 – 86.
4. Đỗ Thanh Kim Hường, Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Thơm, Phạm Thị Thanh Nhân, Vũ Thị Thu Thủy, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2018), “Đặc điểm của trình tự mã hóa nhân tố phiên mã dehydration responsive element binding phân lập từ cây đậu tương”, *Proceedings Hội nghị nghiên cứu&giảng dạy sinh học toàn quốc, Quy Nhơn 5-2018*, tr. 107-114. ISBN 978-604-913-695-5.

5.2. Sản phẩm đào tạo

Đào tạo thạc sĩ: 03 học viên cao học đã bảo vệ

1. Phạm Minh Hào (2017), *Nghiên cứu chuyển gen GmDREB vào giống đậu tương ĐT12*. Luận văn thạc sĩ sinh học, chuyên ngành Di truyền học, Trường Đại học Sư phạm-ĐH Thái Nguyên.

2. Nguyễn Việt Nga (2018), *Phân lập gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB6 từ cây đậu tương phục vụ thiết kế vector chuyển gen thực vật*, Luận văn thạc sĩ sinh học, chuyên ngành Di truyền học, Trường Đại học Sư phạm-ĐH Thái Nguyên.

3. Vũ Thu Trang (2019), *Nghiên cứu hệ thống tái sinh in vitro phục vụ chuyển gen ở cây đậu Nho nhe (Vigna umbellata)”*, Luận văn thạc sĩ sinh học, chuyên ngành Di truyền học, Trường Đại học Sư phạm-ĐH Thái Nguyên.

Hỗ trợ đào tạo tiến sĩ:

- Phutthakone Vaciata “*Nghiên cứu biểu hiện gen GmDREB nhằm nâng cao khả năng chịu hạn ở cây chuyển gen*”. Luận án tiến sĩ sinh học, chuyên ngành Di truyền học. Trường Đại học Sư phạm-Đại học Thái Nguyên.

- Tiến độ thực hiện luận án đúng kế hoạch. NCS Phutthakone Vaciata là đồng tác giả một bài báo quốc tế.

5.3. Sản phẩm ứng dụng

- Thiết kế thành công 01 cấu trúc vector chuyển gen: *pBII21_GmDREB6*;

- Tạo được 04 dòng cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6* ở thế hệ T2 (T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10) có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen.

6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích đem lại của kết quả nghiên cứu:

- Kết quả chuyển thành công cấu trúc mang gen *GmDREB6* vào giống đậu tương DT84 là cơ sở cho việc sử dụng cấu trúc vector *pBI121_GmDREB6* chuyển vào các giống đậu tương khác, góp phần tạo các giống đậu tương có chịu mặn, chịu hạn cao ở nước ta.

- Các kết quả nghiên cứu là cơ sở phát triển nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện khả năng chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương và các cây trồng khác tại các phòng thí nghiệm: Công nghệ gen, Công nghệ tế bào thực vật của Trường Đại học Sư phạm-ĐH Thái Nguyên và tại các phòng thí nghiệm của Trường Đại học Khoa học-ĐH Thái Nguyên.

- Kết quả nghiên cứu và các bài báo công bố trên các tạp chí khoa học- công nghệ được sử dụng làm tài liệu phục vụ đào tạo và nghiên cứu cho sinh viên, học viên cao học, nghiên cứu sinh và cán bộ của Trường Đại học Khoa học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên và một số trường đại học khác.

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information

- Project title: Initial research on creation of GmDREB6 transgenic soybean lines with high drought tolerance
- Code number: B2017-TNA-38
- Coordinator: Prof. Dr. Chu Hoang Mau
- Implementing institution: Thai Nguyen University.
- Duration: 30 months.

2. Objective(s)

- i) Analysis of the activity and biological function of *GmDREB6* transgene in model tobacco plants.
- ii) Creating transgenic soybean lines with higher drought tolerance than non-transgenic plants by transgenic technique that encodes transcription factor DREB6.

3. Creativeness and innovativeness

1) The coding fragment of GmDREB6 gene (cDNA) was isolated from the DT2008 soybean cultivar with 693 bp in size, encoded 230 amino acids. Successfully designed *pBII21_GmDREB6* transgenic vector containing artificial *GmDREB6* gene sequences. GmDREB6 transgene has been incorporated into the genome and well activity in tobacco plants.

2) Ten transgenic soybean plants have been created and the transgenic plants grow, develop normally in conditions of greenhouse. It was demonstrated that *GmDREB6* transgene was inherited from generation T0 to T1 generation and expressed into recombinant protein DREB6.

3) It was demonstrated that the overexpression of *GmDREB6* transgene increased transcriptional activity of *GmP5CS* gene and improved proline accumulation in transgenic soybean plants.

4) Four transgenic soybean lines T2-2, T2-4, T2-7 and T2-10 were produced. Transgenic lines had transcription levels of *GmP5CS* gene, accumulation of proline and tolerance to salinity and drought were higher than non-transgenic plants.

4. Research results

(1) The encoding fragment of *GmDREB6* gene isolated from DT2008 soybean cultivar is 693 bp in size, encoded 230 amino acids. The *pBI121_GmDREB6* transgenic vector contains the artificial *GmDREB6* gene that was successfully designed and created recombinant *Agrobacterium tumefaciens* carrying the *GmDREB6* gene.

(2) The results of Southern blot analysis and RT-PCR showed that *GmDREB6* transgene was incorporated into the genome and well activity in tobacco plants.

(3) The structure carrying *GmDREB6* transgene was successfully transformed into soybean plants and from 450 transformed samples, selective results with kanamycin antibiotics, created 10 transgenic soybean plants which developed normally under conditions of greenhouse.

(4) *GmDREB6* transgene was incorporated into the soybean genome in T0 and confirmed by Southern blot. It was demonstrated that *GmDREB6* transgene was inherited from T0 generation to T1 generation and expressed into DREB6 recombinant protein.

(5) The overexpression of *GmDREB6* transgene increased transcriptional activity of *GmP5CS* gene and improved proline accumulation in transgenic soybean plants. Four transgenic soybean lines T2-2, T2-4, T2-7 and T2-10 were produced. Transgenic lines had transcription levels of *GmP5CS* gene, accumulation of proline and tolerance to salinity and drought were higher than non-transgenic plants.

5. Products

5.1. Journal papers

1. Thi Ngoc Lan Nguyen, Phutthakone Vaciaya, Thi Mai Thu Lo, Thi Hai Yen Nguyen, Thi Thanh Nhan Pham, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2019), "Design of Construct Carrying *GmDREB6* to Enhance Soybean Gene Expression Related to Abiotic Stress Response", *JERS, European Journal of Engineering Research and Science* 4 (6), pp. 135-139.
2. Lo Thi Mai Thu, Nguyen Viet Nga, Nguyen Thi Ngoc Lan, Chu Hoang Mau (2018), "Characteristics of *GmDREB6* gene isolated from drought tolerant

soybean cultivar DT2008", *Journal of Science and Technology, University Thai Nguyen* 187 (11), p.163-168.

3. Pham Thi Thanh Nhan, Pham Minh Hao, Nguyen Thi Ngoc Lan, Chu Hoang Mau (2018), "Study on gene transfer of GmDREB gene into DT12 soybean variety", *Journal of Science and Technology, Thai Nguyen University* 180 (04), p. 81 - 86.
4. Do Thanh Kim Huong, Nguyen Thi Hai Yen, Nguyen Thi Thom, Pham Thi Thanh Nhan, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son, Chu Hoang Mau (2018), "Characteristics of the encoding sequence of dehydration responsive element binding transcription factors isolated from soybean plants ", *Proceedings National Conference on Biological Research & Teaching, Quy Nhon 5-2018*, p. 107-114. ISBN 978-604-913-695-5.

5.3. Education

Master training: 03 master students graduated.

- 1) Pham Minh Hao (2017), *Research on gene transfer of GmDREB gene into DT12 soybean variety*. The Biological master thesis, Thai Nguyen University of Education, TNU.
- 2) Nguyen Viet Nga (2018), *Isolation of gene which encoding transcription factor DREB6 from soybean plants to design plant transgenic vector*. The Biological master thesis, Thai Nguyen University of Education, TNU.
- 3) Vu Thu Trang (2019), *Research on in vitro regeneration system for gene transfer in Vigna umbellata (Vigna umbellata)*. The Biological master thesis, Thai Nguyen University of Education, TNU.

Supported training for PhD student:

- Phutthakone Vaciaxa, "Study on GmDREB gene expression to improve drought tolerance in transgenic plants". Thesis of Ph.D in Biology, specialized in Genetics. Thai Nguyen University of Education, TNU.

- Thesis of PhD student implemented as planned and on schedule. PhD student Phutthakone Vaciaxa is co-author of an international article.

5.4. In terms of application

- Successful design *pBI121_GmDREB6* transgenic vector.

- Created four genetically modified soybean lines with *GmDREB6* transgene in T2 generation (T2-2, T2-4, T2-7 and T2-10). Transgenic lines had transcription levels of *GmP5CS* gene, accumulation of proline and tolerance to salinity and drought were higher than non-transgenic plants.

6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results

- The results of successful transferred of *pBI121_GmDREB6* structure into DT84 soybean cultivar is the basis for using the transgenic vector constructs to transferred into other soybean cultivars, contribute to creating transgenic soybean cultivars with high salinity and drought tolerance in our country.

- The research results are the basis of research development on application of transgenic technology to improve the resistance to abiotic stresses of soybean and other crops at the laboratory, such as genetic Engineering, plant cell Biotechnology of College of Education and the laboratory of College of Sciences- Thai Nguyen University.

- Research results and articles published in the scientific and technological journals are also used as references in teaching and scientific research for students, undergraduate students, graduate students from College of Education and College of Sciences- Thai Nguyen University and some other universities.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu

Đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) là loại cây trồng chiếm vị trí quan trọng trong cơ cấu cây nông nghiệp và trong đời sống của con người. Đậu tương không chỉ có giá trị cao về kinh tế và dinh dưỡng, mà còn giữ vai trò trong việc cải thiện độ phì và sử dụng bền vững tài nguyên đất canh tác.

Đậu tương được xem là cây trồng nhạy cảm với hạn và thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Hạn là yếu tố phi sinh học nghiêm trọng nhất và có thể làm giảm năng suất đậu tương khoảng 40%, đồng thời làm giảm chất lượng hạt. Hạn ảnh hưởng đến tất cả các thời kỳ sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương, thời kỳ ra hoa và thời kỳ sau ra hoa đã được chứng minh là những thời kỳ bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất. Hiện nay, do biến đổi khí hậu toàn cầu, đặc biệt là hạn kéo dài, lượng mưa không đều ở các thời điểm trong năm và giữa các vùng miền đã gây khó khăn cho sản xuất nông nghiệp ở nhiều quốc gia, trong đó có Việt Nam. Nước ta có khoảng 75% diện tích là đồi núi, đất dốc, khả năng giữ nước kém; mặt khác, hiện tượng El Nino gây khô hạn ở các quốc gia thuộc đông bán cầu và các nước thường xuyên chịu ảnh hưởng của khô hạn do El Nino là Australia, Philippines, Indonesia, Thái Lan, Việt Nam... Trong một vài năm gần đây, miền Trung và Tây Nguyên nước ta phải hứng chịu những đợt hạn hán kéo dài và nghiêm trọng, gây ảnh hưởng rất lớn và khó khăn cho việc canh tác các loại cây trồng nói chung và cây đậu tương nói riêng. Do đó, giải pháp chọn tạo giống đậu tương có khả năng chịu hạn tốt ứng phó với biến đổi khí hậu và hiện tượng El Nino là vấn đề cấp thiết, mang tính thời sự ở Việt Nam cũng như đối với nhiều quốc gia trên thế giới.

Đặc tính chịu hạn, chịu mặn và chịu các stress phi sinh học khác của cây đậu tương do nhiều gen quy định, sản phẩm của các gen này liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện khả năng chịu hạn như gen liên quan đến tổng hợp proline, sự

kéo dài rễ, ... hoặc gen điều hoà hoạt động của nhóm gen chịu hạn. Nghiên cứu sự biểu hiện các gen điều hoà sự phiên mã của nhóm gen chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học là cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong sự phát triển giống đậu tương chống chịu khô hạn, mặn, nhiệt, ... và ưu việt hơn kỹ thuật chuyển gen chức năng đơn lẻ. Vì vậy, việc tăng cường biểu hiện gen có khả năng điều tiết của một yếu tố phiên mã kích thích biểu hiện của nhiều gen mục tiêu kiểm soát đặc tính chịu hạn, chịu mặn là rất quan trọng. Một số gen ở đậu tương đã được mô tả là có phản ứng với tác động của hạn ở mức phiên mã. Protein DREB (dehydration responsive element binding) là một phân họ của nhân tố phiên mã AP2/ERF có chức năng điều khiển sự biểu hiện của một số gen cảm ứng với stress hạn từ ngoại cảnh, nâng cao khả năng chịu hạn ở nhiều loài thực vật, trong đó có đậu tương. Trình tự *cis* và nhân tố *trans* giữ vai trò quan trọng trong sự biểu hiện các gen đáp ứng tác động của hạn. DREB - nhân tố có tác động *trans* có thể liên kết với trình tự *cis* để kích hoạt biểu hiện gen mục tiêu khi có tín hiệu stress ở thực vật. Phân họ DREB ở cây đậu tương gồm các thành viên được xác định có trong hệ gen, đó là các gen *GmDREBa*, *GmDREBb*, *GmDREBc*, *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5*, *GmDREB6* và *GmDREB7*. Tuy nhiên một vài thành viên trong số này còn chưa rõ tác động cụ thể như thế nào đối với tính chịu hạn, trong đó có gen *GmDREB6*. Tiếp cận ứng dụng kỹ thuật chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB và làm rõ chức năng của một vài gen *GmDREB*, nhằm cải thiện đặc tính di truyền, tạo dòng cây đậu tương chuyển gen thích nghi với điều kiện hạn được đặc biệt quan tâm. Vì vậy, gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB liên quan đến tính chống chịu các stress phi sinh học, trong đó có tính chịu hạn hạn được lựa chọn làm gen chuyển trong nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương.

Xuất phát từ những cơ sở trên chúng tôi đã tiến hành đề tài: “Nghiên cứu bước đầu tạo dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* có khả năng chịu hạn cao”

2. Những đóng góp khoa học của đề tài

Đề tài là công trình nghiên cứu có hệ thống, từ việc phân lập gen, thiết kế vector chuyển gen đến phân tích biểu hiện gen, tạo dòng đậu tương chuyển gen và phân tích biểu hiện đặc tính sinh học của gen chuyển.

Cụ thể là:

1) Đã phân lập được đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* từ giống đậu tương DT2008 với kích thước là 693 bp mã hóa 230 amino acid. Thiết kế thành công vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* chứa trình tự gen *GmDREB6* nhân tạo. Gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen và hoạt động tốt trong cây thuốc lá.

2) Đã tạo được 10 cây đậu tương chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới. Đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* được di truyền từ thế hệ T0 sang thế hệ T1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp DREB6.

3) Đã chứng minh được sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmDREB6* đã làm tăng hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* và cải thiện sự tích lũy proline trong cây chuyển gen.

4) Tạo được 4 dòng chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 ở thế hệ T2 có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy amino acid proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Kết quả nghiên cứu đạt được của đề tài có giá trị khoa học và thực tiễn trong tiếp cận nghiên cứu nâng cao khả năng chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Về mặt khoa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài góp phần làm sáng tỏ đặc điểm cấu trúc và chức năng của *GmDREB* và *GmDREB6* của cây đậu tương

Phát triển thành công cấu trúc vector mang gen chuyển *GmDREB6* và sự biểu hiện mạnh của protein tái tổ hợp DREB6 đã làm tăng tích lũy prolin ở cây đậu tương. Các dòng đậu tương chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn cây đối chứng không chuyển gen, có giá trị làm nguyên liệu cho chọn giống đậu tương chịu hạn.

Các bài báo đăng tải trên các tạp chí khoa học-công nghệ quốc tế và trong nước là những tư liệu có giá trị sử dụng trong nghiên cứu và giảng dạy.

Về mặt thực tiễn

Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* có thể sử dụng chuyển vào giống đậu tương khác hoặc loài cây trồng khác trong mục đích làm tăng cường khả năng chống chịu của cây chuyển gen. Các dòng chuyển gen làm nguyên liệu cho chọn giống để tạo ra các giống đậu tương có tính chịu hạn được cải thiện. Các kết quả nghiên cứu phân lập và biểu hiện gen *GmDREB6*, tạo dòng cây đậu tương chuyển gen đã góp phần giải quyết cơ sở lý luận của vấn đề nâng cao khả năng chống chịu bằng tăng cường biểu hiện gen mã hóa nhân tố phiên mã. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học vững chắc cho hướng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen vào việc cải thiện khả năng chống chịu của cây đậu tương, mở ra triển vọng hướng ứng dụng công nghệ gen trong chọn giống đậu tương.

Chương 1. MỤC TIÊU, NỘI DUNG, ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI, CÁCH TIẾP CẬN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1.1.1. Mục tiêu nghiên cứu

i) Phân tích được hoạt động và chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6* trên cây mô hình;

ii) Tạo được dòng cây chuyển gen có khả năng chịu hạn cao hơn cây đối chứng bằng kỹ thuật chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6*

1.1.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6*

Nghiên cứu thông tin gen *GmDREB6*, thiết kế cặp mồi nhân gen *GmDREB6*, Tách dòng phân tử và giải trình tự gen *GmDREB6*.

Từ thông tin về gen *GmDREB6* phân lập được và trình tự gen *GmDREB6* trên GenBank thiết kế và tổng hợp cấu trúc gen chuyển *GmDREB6* nhân tạo.

Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang cấu trúc chứa gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6*;

Tạo dòng vi khuẩn *Agrobacterium* tái tổ hợp mang cấu trúc gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB6;

Nội dung 2: Phân tích hoạt động của vector chuyển gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá mô hình

Tạo cây thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*

Phân tích sự có mặt và sự dung hợp của gen chuyển vào hệ gen cây thuốc lá bằng PCR và Southern blot.

Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB6* ở cây thuốc lá chuyển gen.

Nội dung 3: *Nghiên cứu chuyển gen GmDREB6 và tạo cây đậu tương chuyển gen*

Chuyển cấu trúc mang gen chuyển vào đậu tương nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* lây nhiễm qua rách lá mầm hạt chín.

Tái sinh chồi, ra rễ, chọn lọc bằng kháng sinh và tạo cây đậu tương chuyển gen T₀.

Ra cây đậu tương chuyển gen T₀ và trồng trong nhà lưới.

Nội dung 4: *Phân tích biểu hiện của gen chuyển ở các dòng đậu tương chuyển gen*

Phân tích cây đậu tương chuyển gen bằng xác định sự có mặt của gen chuyển bằng PCR và lai Southern.

Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển ở mức phiên mã bằng RT-PCR, Real time RT-PCR và sự biểu hiện protein tái tổ hợp GmDREB6 bằng Western blot.

Nội dung 5: *Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển GmDREB6*

Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển thông qua so sánh khả năng tích lũy proline giữa cây chuyển gen và cây không chuyển gen.

1.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

1.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm và biểu hiện gen *GmDREB6* của cây đậu tương;

Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* và tạo cây đậu tương chuyển gen có khả năng chống chịu stress phi sinh học.

1.2.2. Vật liệu thực vật

Sử dụng giống đậu tương DT84 làm vật liệu nhận gen trong chuyển gen do Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Cây thuốc lá trong ống nghiệm lưu giữ trong phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm-ĐH Thái Nguyên cung cấp. Thuốc lá được sử dụng làm cây mô hình trong thí nghiệm biểu hiện gen *GmDREB6*.

1.2.3. Các chủng vi khuẩn và các loại vector

Các chủng vi khuẩn và các loại vector sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam gồm: *Escherichia coli* DH5 α , *A. tumefaciens* CV58, *A. tumefaciens* AGL1; vector chuyển gen *pBI121* sử dụng trong quá trình nhân dòng, thiết kế vector chuyển gen và lây nhiễm vào thực vật.

1.2.4. Thiết kế, tổng hợp gen *GmDREB6* và các cặp mồi PCR

- Dựa trên những thông tin về gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự gen *GmDREB6* mang mã số EF551166 trên GenBank [26], gen nhân tạo *GmDREB6* được thiết kế, tổng hợp và gắn trong vector pUC18 (*pUC18_GmDREB6*).

- Sử dụng cặp mồi *DREB6-F/DREB6-R* để nhân bản gen *GmDREB6* từ giống đậu tương DT2008; cặp mồi *XbaI-DREB6-F/ DREB6-SacI-R* sử dụng trong kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong cây chuyển gen; cặp mồi *qGmP5CS-F/ qGmP5CS-R* và *qAct-F /qAct-R* sử dụng trong phân tích Real time RT-PCR. Trình tự nucleotide của các cặp mồi được trình bày ở bảng 1.1.

1.2.5. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Các loại Kít thao tác phân tử từ các hãng Fermentas, Bio-Neer như: kít Trizol Reagents - tách chiết RNA tổng số; kít Maxima® First Strand cDNA Synthesis - tổng hợp cDNA; kít GeneJET PCR Purification - tinh sạch sản phẩm PCR; kít Plasmid Extraction - tách chiết plasmid từ vi khuẩn.

Bảng 1.1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Primers	Nucleotide sequence (5' - 3')	Size
<i>DREB6-F/</i> <i>DREB6-R</i>	ATGGTCATGGAAGAATCTAAC TTAATATGATTCCCATAGA	693 BP
<i>XbaI-DREB6-F/</i> <i>DREB6-SacI-R:</i>	ATGAAGTTCAACCAACCACTTCAT ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGT	741 bp
<i>nptII-F /nptII-R</i>	GAGGCTATTCGGCTATGACTG ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	963 bp
<i>qGmP5CS-F/</i> <i>qGmP5CS-R</i>	CGAACTGAGCTTGCAGAGGGGC TCGCTTAGCCTCCTTGCCTCC	165 bp
<i>qAct-F /qAct-R</i>	GATCTTGCTGGTCGTGATCTT GTCTCCAACCTTGTCTCATAGTC	152 bp
<i>pUC18-F/pUC18-R</i>	GTAAAACGACGGCCAGT CAGTATCGACAAAGGAC	840 bp

Các loại enzyme sử dụng của hãng Fermentas: *XbaI*, *SacI*, DNA T4 ligase,... Các hoá chất: bacto pepton, yeast extract, agarose, sucrose, glucose, trypton, X-gal, KCl, Tris HCl, EDTA, NaOH, MgSO₄, MgCl₂, Glycerol, CaCl₂; các loại kháng sinh kanamycin, rifamycine, cefotaxime, carbenicillin,... của các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số hãng hóa chất khác.

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transilluminiator, Bio-Rad, Mỹ), máy Voltex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Plulser, máy xác định hàm lượng nucleic acid NanoDrop, cùng với các thiết bị hiện đại khác.

1.3. PHẠM VI VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

1.3.1. Phạm vi nghiên cứu

Để thực hiện được mục tiêu đặt ra, đề tài thực hiện trong phạm vi nghiên cứu như: (1) Phân lập gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6* từ giống đậu tương chịu hạn DT2008 cùng với việc phân tích gen *GmDREB6* trên GenBank

để có thông tin về đặc điểm của gen làm cơ sở cho việc thiết kế gen *GmDREB6* nhân tạo. (2) Sử dụng gen *GmDREB6* thiết kế vector chuyển gen thực vật và phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* ở cây thuốc lá mô hình. (3) Chuyển gen *GmDREB6* vào giống đậu tương DT84 và phân tích cây chuyển gen.

1.3.2. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm phân lập gen, chuyển gen được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Thí nghiệm chuyển gen thực hiện từ năm 2017 đến tháng 12 năm 2018.

Thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen và phân tích biểu hiện gen được tiến hành tại phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

1.4. CÁCH TIẾP CẬN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

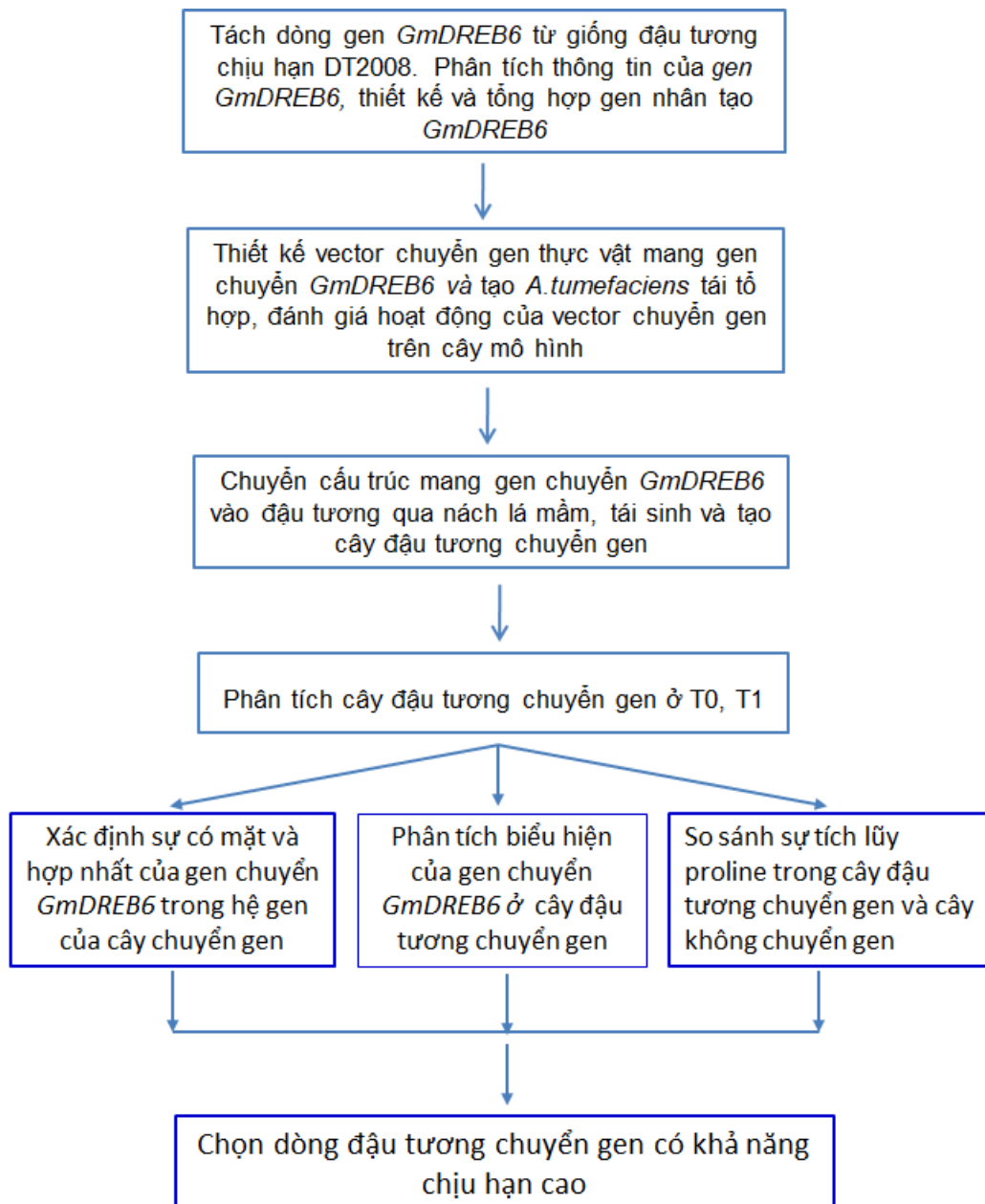
1.4.1. Cách tiếp cận nghiên cứu

Tạo dòng cây đậu tương có khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học được tiến hành theo cách tiếp cận ứng dụng kỹ thuật chuyển gen, cụ thể là: (i) Nhân bản, tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB6* từ cây đậu tương; (ii) Sử dụng thông tin về trình tự gen phân lập được và trình tự gen *GmDREB6* trên GenBank để thiết kế vector chuyển gen và chuyển vào cây đậu tương nhằm tạo dòng đậu tương chuyển gen. (iii) Phân tích gen chuyển và đánh giá các dòng cây đậu tương chuyển gen tạo vật liệu tạo giống đậu tương có khả năng chịu hạn.

1.4.2. Phương pháp nghiên cứu

1.4.2.1. Sơ đồ thí nghiệm của đề tài

Các thí nghiệm trong đề tài được thực hiện theo sơ đồ ở hình 1.1.



Hình 1.1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát

1.4.2.2. Phương pháp phân lập gen *GmDREB6* từ cây đậu tương

Thu thập thông tin về gen *GmDREB6* của cây đậu tương. Thiết kế cặp mồi nhân gen *GmDREB6* dựa trên trình tự gen mang mã số EF551166 công bố trên GenBank [26].

Tách chiết RNA tổng số bằng cách sử dụng Trizol Regents (của hãng Invitrogen) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tạo cDNA bằng phản ứng phiên mã ngược: ARN tổng số được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cADN, cDNA được tổng hợp theo quy trình RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Khuếch đại gen *GmDREB6* từ cDNA;

Tinh sạch và gắn đoạn gen vào vector tách dòng pBT, biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α , tách plasmid tái tổ hợp.

Xác định trình tự gen trên thiết bị giải trình tự DNA tự động. Xử lý và phân tích trình tự bằng các phần mềm chuyên dụng (BioEdit, DNASTar và Blast trong NCBI).

1.4.2.3. Thiết kế vector chuyển gen thực vật và tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp

Sử dụng vector chuyển gen pBI121 có sự điều khiển của promotor 35S và ghép nối gen *GmDREB6* nhân tạo nhờ enzyme nối ligase. Vector chuyển gen mang gen *GmDREB6* được thiết kế theo hai bước cơ bản: (1) thiết kế cấu trúc độc lập bao gồm gen *GmDREB6*, phân đoạn *cmv* và vị trí cắt của cặp enzyme *XbaI* / *SacI* (*GmDREB6-cmv*); (2) chèn cấu trúc vào vector chuyển gen thực vật, pBI121 để tạo thành vector tái tổ hợp *pBI121_GmDREB6*. Kiểm tra vector tái tổ hợp bằng RE. Chọn dòng vector tái tổ hợp bằng colony-PCR.

Tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang cấu trúc gen *GmDREB6*. Chọn dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp bằng colony- PCR.

1.4.2.4. Kỹ thuật chuyển gen vào thuốc lá và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen

Nuôi chọn lọc *A.tumefaciens* trong 15ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc tạo dịch huyền phù. Nuôi phục hồi ở 28°C đạt OD_{600nm} = 0,8. Ly tâm thu cặn tế bào và hòa cặn trong môi trường CCM.

Chuyển đổi vào thuốc lá thông qua *A.tumefaciens* và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được tiến hành như sau: Lá thuốc lá được cắt thành các mảnh 1 × 1 cm, ngâm trong tế bào huyền phù của *A.tumefaciens* tái tổ hợp trong 10 phút, và

sau đó tái sinh đa chồi trên môi trường MS có thêm BAP và kanamycin. Các chồi chuyển vào môi trường RM để tạo rễ có bổ sung kanamycin. Các cây con được trồng trong nhà lưới.

Đánh giá hoạt động của vector chuyển gen mang cấu trúc *GmDREB6* trên cây chuyển gen bằng PCR, Southern blot và RT-PCR.

1.4.2.5. Kỹ thuật chuyển gen vào nách lá mầm đậu tương giống DT84

Phương pháp chuyển gen thông qua nách lá mầm được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Olhoft và đtg (2001) [36]. Thành phần môi trường nuôi cây *in vitro* và tái sinh cây đậu tương chuyển gen được trình bày ở bảng 1.2.

Có thể trình bày tóm tắt thí nghiệm chuyển gen và tạo các dòng cây đậu tương chuyển gen mang cấu trúc chứa gen chuyển *GmDREB6* ở giống đậu tương DT84 như sau:

(1) Khử trùng hạt: Chọn hạt đậu tương mẩy, mới thu hoạch, có khả năng nảy mầm. Khử trùng hạt bằng khí clo trong 12 giờ.

(2) Tạo nguyên liệu nhận gen và làm mới *A.tumefaciens* tái tổ hợp

Hạt sau khi khử trùng được nảy mầm trên môi trường GM (muối B₅ 3,052g/l + sucrose 20g/l + agar 6g/l + vitamin B₅ 1mg/l). Mầm 5 ngày tuổi cắt bỏ thân và rễ mầm, thu lá mầm.

(3) Gây tổn thương nách lá mầm trong dịch khuẩn *A.tumefaciens* và lây nhiễm khuẩn vào lá mầm trong 30 phút.

(4) Đồng nuôi cấy trong môi trường CCM (muối B₅ 0,316 g/l + MES 3,9 g/l + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,4. Bổ sung trong box vitamin B₅ (1 mg/l) + acetosyringon (0,2 mM) + L-cystatin (400 mg/l) + sodium thiosulfate (200 mg/l) + DTT (154 mg/l) + GA₃ (0,25 mg/l) + BAP (2,5 mg/l).

(5) Cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường SIM lần 1 (muối B₅ (2,0 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50

mg/l) và SIM lần 2 (muối B₅ (3,052 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), PH = 5,6. Bổ sung vitamin B₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + 400 mg/l + kanarmycine 75 mg/l).

Bảng 1.2. Thành phần các môi trường trong tái sinh cây đậu tương

Môi trường	Thành phần
Nảy mầm (MS)	Muối B ₅ (3,052 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,8 + vitamin B ₅ (1 mg/l).0
Đồng nuôi cấy (CCM)	Muối B ₅ (0,316 g/l) + MES (3,9 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,4. Bổ sung trong box vitamin B ₅ (1 mg/l) + acetosyringon (0,2 mM) + L-cystatin (400 mg/l) + sodium thiosulfate (200 mg/l) + DTT (154 mg/l) + GA ₃ (0,25 mg/l) + BAP (2,5 mg/l)
Cảm ứng tạo chồi (SIM)	-Môi trường SIM lần 1: Muối B ₅ (2,0 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B ₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l
	- Môi trường SIM lần 2: Muối B ₅ (3,052 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), PH = 5,6. Bổ sung vitamin B ₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + 400 mg/l + kanarmycine 75 mg/l
Kéo dài chồi (SEM)	MS (4,3 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B ₅ + L-asparagine + L-pyron glutamic acid + IAA (0,1 mg/l)+ GA ₃ (0,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l
Tạo rễ (RM)	MS (1,58 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung IAA (0,5 mg/l)+ vitamin B ₅ (1 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l

(6) Thí nghiệm kéo dài chồi: cắt bỏ lá mầm và chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM (MS (4,3 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B₅ + L-asparagine + L-pyrone glutamic acid + IAA (0,1 mg/l) + GA₃ (0,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l).

(7) Tạo rễ: Chồi được chuyển sang môi trường ra rễ RM (MS (1,58 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung IAA (0,5 mg/l) + vitamin B₅ (1 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l).

(8) Ra cây: Cây chuyển gen và cây không chuyển gen *in vitro* được chuyển ra trồng trên giá thể với tỷ lệ 1 trâu hun: 1 cát vàng trong điều kiện nhà lưới.

1.4.2.6. Phân tích, đánh giá cây chuyển gen

- Phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* bằng PCR và bằng Southern blot.

- Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB6* ở mức phiên mã bằng RT-PCR, Real time RT-PCR và ở mức dịch mã tạo protein tái tổ hợp bằng phương pháp điện di protein, kỹ thuật Western blot.

- Đánh giá chức năng sinh học của gen chuyển thông qua phân tích, so sánh hàm lượng proline giữa dòng cây chuyển gen và cây không chuyển gen (WT) trong điều kiện xử lý bằng stress muối.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen bằng PCR

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây chuyển gen và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *XbaI-DREB6-F/ DREB6-SacI-R* để xác định sự có mặt của gen *GmDREB6* trong cây thuốc lá và cây đậu tương chuyển gen. Sản phẩm PCR nhân bản gen *GmDREB6* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

Phương pháp Southern blot

Để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển và số bản sao mà gen chuyển *GmDREB6* hợp nhất vào hệ gen cây chuyển gen, chúng tôi thực hiện Southern blot theo mô tả của Southern (1975) [44] với các bước cơ bản sau:

(1) Tách chiết DNA tổng số của cây chuyển gen cần phân tích, đạt nồng độ 10 µg mẫu DNA tổng số. Sau đó tiến hành tinh sạch DNA tổng số để phục vụ cho phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn.

(2) DNA tổng số được tách đảm bảo độ tinh sạch cho phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn với thành phần và điều kiện phản ứng ở bảng 1.3.

Bảng 1.3. Thành phần phản ứng cắt DNA tổng số bằng *SalI*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	Enzyme <i>SalI</i>	10u/µl	5
2	Buffer	10 X	5
3	DNA	30 µg /µl	30
4	Nước khử ion	-	
Tổng			50
<i>Điều kiện phản ứng: 37 °C để qua đêm</i>			

(3) Điện di sản phẩm cắt DNA tổng số trên gel agarose 1%, ở điện thế thấp trong thời gian dài (6 giờ).

(4) Chuyển lên màng nitrocellulose: Màng lai được cắt vừa với bản gel và đặt dưới bản gel, một cột giấy được đặt phía dưới nhằm tạo áp lực thẩm thấu trong khi dung dịch chuyển màng thấm truyền từ trên thông qua các tấm giấy lọc được cấp từ khay đựng buffer. Quá trình chuyển màng hoàn tất sau 3 giờ với bản gel dày dưới 5 mm, hoặc qua đêm. Sau khi chuyển màng, màng lai được rửa với dung dịch 2X SSC và tiến hành lai với mẫu dò.

(5) Tổng hợp mẫu dò (probe)

Mẫu dò gen GmDREB6: Nhân dòng trình tự gen *GmDREB6* từ plasmid *pUC18_GmDREB6* bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu *XbaI-DREB6-F/DREB6-SacI-R* (Bảng 1.1).

Mẫu dò gen nptII: Nhân dòng trình tự gen *nptII* từ plasmid mang gen *nptII* bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu *nptII-F/nptII-R*.

Mẫu PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch PCR được sử dụng làm khuôn cho phản ứng tổng hợp mẫu dò theo hướng dẫn của bộ Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit.

(6) Tiền lai và lai: Màng lai được cố định bằng dung dịch tiền lai ($200\mu\text{l}/\text{cm}^2$) trong 4h ở 44°C trong ống lai. Sau đó đổ bỏ dung dịch tiền lai, bổ sung dung dịch lai ($60\mu\text{l}/\text{cm}^2$), lai qua đêm ở 44°C .

(7) Rửa màng: Màng lai được rửa 2 lần với đệm rửa 2x ở nhiệt độ phòng, 1 lần với đệm rửa 1x ở 65°C trong 15 phút, 2 lần với đệm rửa 0.1x ở 65°C trong thời gian 15 phút.

(8) Hiện màng: Phức hợp enzyme Streptavidin-AP có khả năng gắn bám đặc hiệu với gốc biotin trên mẫu dò. Ngoài ra, enzyme Alkaline phosphatase có khả năng phân hủy BCIP-T (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt) thành hợp chất có màu tím đen. Nhờ vậy có thể phát hiện mẫu dò gắn với đoạn DNA cần nghiên cứu trên màng lai. Quy trình này được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit Biotin Chromogenic Detection Kit (hãng Themoscience).

Phân tích cây chuyển gen bằng lai Western

Kiểm tra hoạt động của gen chuyển qua sự có mặt của protein tái tổ hợp *GmDREB6* trong cây chuyển gen bằng Western blot [45] với các bước cơ bản sau: (1) Tách chiết protein tổng số (nghiền 0,5 g lá trong nitơ lỏng và hoà tan trong 1 ml PBS + Tween 0,05%, ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút); (2) Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide - SDS 10%; (3) Chuyển protein trên gel điện di lên màng lai nitrocellulose bằng máy Pierce G2 Fast Blotter (25V, 1,3 mA trong 20 phút); (4) Màng chứa kháng nguyên c-myc được phủ bằng 5% sữa tách béo pha trong dung dịch PBS + Tween 0,05% trong 16 giờ; (5) Lai kháng thể 1 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS 5% sữa tách béo có chứa kháng thể c-myc với độ pha loãng 700 lần, lắc trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng); (6) Lai kháng thể 2 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS + 5% sữa tách béo có chứa kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (Horse Radish

Peroxidase) trong 2 giờ); (7) Hiện màu trong dung dịch có chứa cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) hoặc DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), hiển thị kết quả dưới ánh sáng thường.

Phân tích cây chuyển gen bằng Real time RT-PCR

Sử dụng kỹ thuật qRT-PCR để phân tích biểu hiện của gen *GmP5CS* ở mức phiên mã của các cây đậu tương không chuyển gen và các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* ở hai điều kiện, trong điều kiện bình thường và stress muối. Mức độ biểu hiện phiên mã của gen *GmP5CS* được xác định bằng phản ứng Real time RT-PCR với thuốc nhuộm huỳnh quang SYBR Green I. RNA tổng số được chiết rút bằng Kit TRIzol và tổng hợp cDNA bằng Kit First Strand cDNA Synthesis. *Actin* là gen tham chiếu được sử dụng để chuẩn hóa lượng cDNA trong mỗi phản ứng qPCR. Tính toán mức biểu hiện bằng công thức $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ theo Livak và Schmittgen 2001.

Xử lý stress muối

Hạt của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 nảy mầm và phát triển thành cây T2 (T2-2, T2-4, T2-7, T2-10) trong chậu chứa cát sạch. Các dòng đậu tương chuyển gen T2 và cây không chuyển gen sử dụng phân tích biểu hiện của gen *GmP5CS* trong điều kiện stress muối. Xử lý các cây đậu tương non ở giai đoạn ba lá chết bằng NaCl trong 7 ngày; các cây không xử lý (đối chứng) được tưới 2 ngày một lần (điều kiện bình thường) và trong điều kiện stress muối để thích nghi với độ mặn. Xử lý stress muối ở hai mức NaCl 150 mM và NaCl 300 mM.

Phân tích hàm lượng proline trong cây chuyển gen

Phân tích hàm lượng proline ở hai chế độ, điều kiện bình thường và stress hạn muối. Hàm lượng proline của cây chuyển gen được xác định bằng phương pháp của Bates và cs (1973) [3]. Nồng độ proline trong lá của các dòng chuyển gen và cây không chuyển gen được phân tích sau 7 ngày trong điều kiện stress muối. Hàm lượng proline được biểu thị bằng $\mu\text{mol/g}$ khối lượng tươi.

Chương 2. NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

2.1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU THUỘC LĨNH VỰC CỦA ĐỀ TÀI

2.1.1. Cơ chế chịu hạn của thực vật

Stress phi sinh học là nguyên nhân chính dẫn đến mất mùa trên toàn thế giới, gây ra thiệt hại đến năng suất bình quân hơn 50% ở nhiều loại cây trồng [4]. Trong số các stress phi sinh học, hạn là yếu tố chính làm giảm năng suất cây trồng. Stress hạn phá vỡ sự cân bằng nội môi và phân bố ion trong tế bào [68]. Cây trồng phản ứng với các stress hạn thông qua các con đường truyền tin và phản ứng tế bào như tổng hợp các protein stress, tăng cường các chất chống oxy hóa, tích lũy các chất tan [10]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, hạn gây ra những tác động tiêu cực ở tất cả các cấp độ và các giai đoạn phát triển của thực vật. Để kháng lại các stress hạn, trong thực vật diễn ra chuỗi các quá trình hóa sinh, với sự tham gia của rất nhiều yếu tố. Trong điều kiện hạn, các phản ứng sinh hóa khác nhau được kích hoạt trong cây, tích lũy nhiều loại chất dễ hòa tan, như đường, axit amin, glycine betaine và polyamine để giúp các cây trồng đối phó với hạn [19], tăng hàm lượng các chất chống oxy hóa, chẳng hạn như glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) và catalase (CAT) [1].

Gần đây, những hiểu biết về biểu hiện gen, cơ chế phiên mã và cơ chế truyền tín hiệu phản ứng với stress hạn của cây trồng đã được công bố [70]. Những phân tích sinh học phân tử và di truyền học đã tạo nền tảng cho những khám phá chức năng gen và ứng dụng trong kỹ thuật di truyền với việc sử dụng một số gen chức năng hoặc một số gen điều hòa liên quan đến tính chịu hạn, chịu mặn của cây trồng [56]. Vì vậy, cơ sở phân tử đặc tính chịu hạn của thực vật nói chung và cây đậu tương nói riêng cũng dần được sáng tỏ. Các gen phản ứng với stress hạn có thể chia thành 2 nhóm chính: Nhóm gen chức năng mà sản phẩm của chúng tham gia trực tiếp vào các phản ứng stress hạn như gen điều hòa áp suất

thẩm thấu, gen mã hóa các protein chống oxi hóa, gen mã hóa protein LEA (Late embryogenesis abundant), gen mã hóa protein vận chuyển LTP (Lipid transfer protein), aquaporin; nhóm gen điều khiển cho ra các sản phẩm bao gồm các nhân tố phiên mã và các protein kinase truyền tin. Các nhân tố phiên mã liên quan đến khả năng chịu hạn đang được quan tâm nghiên cứu bao gồm DREB, WRKY, bZIP (Basic leucine zipper), MYB (Myeloblastosis oncogene), NCED và AP2/ERF. Các protein kinase truyền tin bao gồm: Protein kinase phụ thuộc Ca^{2+} , MAPK (Mitogen activated protein kinase), RPK (Receptor-like protein kinase), PIK (Phosphatidyl inositol kinase) và protein kinase serine/threonine [29].

Sự biểu hiện của các gen cảm ứng với hạn liên quan chặt chẽ với quá trình phiên mã. Sự biểu hiện của các gen này chịu ảnh hưởng rất nhiều của môi trường trong và ngoài cơ thể và ở nhiều mức độ điều hòa. Các nhân tố phiên mã (Transcription factors - TF) đóng vai trò điều khiển quan trọng của những thay đổi trong biểu hiện gen và phản ứng với các stress môi trường. Có thể thấy rõ ở thực vật, các gen mã hóa nhân tố phiên mã chiếm phần lớn trong hệ gen. Ví dụ, ở cây *Arabidopsis* có đến 1500 TF trong hệ gen [47]. Nhân tố phiên mã TF có kích thích hoặc ức chế quá trình phiên mã. Cả hai loại nhân tố kích hoạt và ức chế quá trình phiên mã đều đã được sử dụng để làm tăng cường khả năng chịu hạn cho cây trồng và hầu hết các gen này đã được xác định và phân tích ở cây *Arabidopsis* [6]. Hiện nay, protein DREB (một trong bốn phân họ lớn của họ AP2/ERF) là nhóm TF được nghiên cứu và thu được các kết quả khả quan trong điều kiện stress phi sinh học, bởi vì nó kích hoạt sự biểu hiện của nhiều gen mục tiêu chịu trách nhiệm kiểm soát các yếu tố liên quan [19]. Wang và cs (2009) [60]. Trong cây *Arabidopsis* nhân tố phiên mã DREB tác động đến 474 gen mục tiêu. Trong số những gen này, có 160 gen có đáp ứng với stress phi sinh học và 27 gen cảm ứng với tình trạng thiếu nước [30]. Như vậy nhân tố phiên mã trong phân họ DREB là đối tượng hấp dẫn cho nghiên cứu đặc tính chịu hạn và tìm biện pháp cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương.

2.1.2. Họ nhân tố phiên mã AP2 và phân họ DREB

Những TF có thể được phân chia thành nhiều loại khác nhau dựa trên cấu trúc vùng liên kết của chúng với sợi DNA. Các nhân tố phiên mã là nhân tố có tác động *trans* liên kết với trình tự *cis* đảm nhận vai trò trung tâm hoạt hóa promoter trong biểu hiện của các gen mục tiêu. Kết quả những phân tích về hoạt hóa promoter phản ứng với điều kiện bất lợi, trình tự *cis* và nhân tố có tác động *trans* liên quan đến phản ứng của các gen với điều kiện bất lợi đã được xác định [58].

Họ AP2/ERF là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã ở thực vật, bao gồm bốn phân họ lớn: AP2 (APETALA 2), RAV (Related to ABI3/VP1), ERF (Ethylene-responsive element binding factor) và DREB (Dehydration responsive element binding) [42]. Vùng AP2 có khoảng 60 amino acid có liên quan chặt chẽ với nhau [62]. Protein thuộc họ AP2/ERF cũng tìm thấy ở cả những thực vật bậc thấp như tảo xanh (*Chlamydomonas reinhardtii*) [43], tương đồng với các miền AP2/ERF ở vi khuẩn. Do đó, có giả thuyết cho rằng các miền AP2/ERF được chuyển từ một loài vi khuẩn *Cyanobacterium* cộng sinh hoặc từ một loại vi khuẩn hay virus bởi hiện tượng biến nạp gen [31]. Ở đầu N và ở đầu C của vùng AP2/ERF chứa có một đoạn xoắn β , tương tự như kiểu xoắn α có chức năng nhận biết điểm bám trên promoter [43].

Từ những năm 80 của thế kỷ XX, các nhà khoa học trên thế giới đã quan tâm nghiên cứu về DREB, giải trình tự nucleotide của gen DREB trên các loài họ cúc (*Asteraceae*), hướng dương (*Helianthus annuus*), lúa mì (*Triticum aestivum* L.)... và kết quả trình tự gen DREB giữa các loài cây trồng và hoang dại đã tìm thấy sự sai khác giữa chúng. Từ đó, các nhà khoa học đã đề xuất phương án cải thiện khả năng chống chịu thông qua việc cải tiến ở mức phân tử của cơ chế này với điều kiện bất lợi trong môi trường sống, đó là chuyển gen mục tiêu từ loài chống chịu tốt vào loài chống chịu kém. Những gen này bao gồm cả các gen chức năng, như gen mã hóa những chất chuyển hóa quan trọng đối với khả năng chịu

hạn, hoặc gen mã hóa các nhân tố phiên mã. Đối với cây đậu tương, hướng nghiên cứu này bước đầu đã đạt được những thành công nhất định.

Nhiều thành viên phân họ DREB phản ứng với điều kiện bất lợi đã được phân lập và mô tả. Những nghiên cứu đã khẳng định các gen trong phân họ DREB là những thành tố quan trọng, liên quan đến sự phản ứng với nhân tố phi sinh học ở thực vật bằng cách điều khiển biểu hiện gen thông qua các trình tự DRE/CRT [64]. Cho đến nay, nhiều nhân tố phiên mã thuộc phân họ DREB từ các loài thực vật khác nhau đã được chứng minh có liên quan đến phản ứng của stress phi sinh học. Cụ thể, các DREB1 và DREB2 đóng vai trò quan trọng trong việc chống chịu stress bằng cách điều hòa biểu hiện của gen thông qua trình tự DRE/CRT trong các promoter ở những gen nhạy cảm với stress. Những nhân tố phiên mã kích hoạt gen chức năng phiên mã thông qua liên kết với các trình tự DRE/CRT để hoạt hóa promoter của chúng [42]. Như vậy, kết quả phát hiện các gen trong phân họ DREB tham gia vào quá trình thích nghi với stress abiotic bằng cách kích hoạt phiên mã thông qua liên kết với các trình tự DRE/CRT trong các promoter điều khiển các gen mục tiêu phản ứng với các stress là cơ sở cho việc nghiên cứu tăng cường khả năng chịu hạn của cây đậu tương bằng kỹ thuật biểu hiện mạnh gen *GmDREB* (Overexpression).

Một số thành viên của phân họ gen DREB được xác định có trong hệ gen của cây đậu tương. Mỗi gen trong họ *DREB* có trình tự, độ dài khác nhau nhưng đều được biểu hiện mạnh khi cây đậu tương gặp hạn. Nhóm DREB1 điều khiển tính chịu hạn, mặn và lạnh; trong khi nhóm DREB2 có vai trò chủ yếu trong điều khiển tính chịu hạn, chịu nóng. Ở Việt Nam, vấn đề nghiên cứu về DREB ở cây trồng nói chung và cây đậu tương nói riêng vẫn còn rất mới mẻ, chỉ có một vài công trình công bố về gen DREB thuộc nhóm nghiên cứu chúng tôi, đó là nghiên cứu đặc điểm cấu trúc gen DREB1 (2010), DREB5 (2011), DREB2 (2015) ... [74]. Tuy nhiên, ở phân họ gen *DREB* của đậu tương, chức năng của một vài gen *GmDREB* cần được làm sáng tỏ, ví dụ như gen *GmDERB5*, *GmDREB6*,

GmDREB7; đồng thời, can thiệp tăng cường biểu hiện (overexpression) gen *GmDREB*, kích hoạt phiên mã làm thay đổi mức độ biểu hiện của các gen chức năng, nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương là những vấn đề cần được giải quyết.

2.1.3. Ứng dụng tiên bộ kỹ thuật trong chuyển gen ở cây đậu tương

Cho đến nay, các nhà khoa học đã và đang sử dụng nhiều hệ thống sinh học, bao gồm vi khuẩn, nấm, các dòng tế bào côn trùng, thực vật, động vật có vú, virus của côn trùng, của thực vật, các sinh vật đa bào,... để tạo protein tái tổ hợp. So với các hệ thống truyền thống, thực vật có nhiều lợi thế trong việc sản xuất protein tái tổ hợp, bởi vì: (1) Khả năng glycosid hoá các protein, bởi các glycoprotein là nhóm protein có vai trò quan trọng trong các phản ứng miễn dịch; (2) Protein tạo thành từ thực vật tương đối an toàn so với protein có nguồn gốc động vật bậc cao; (3) Thực vật có thể trồng trên diện tích lớn với chi phí thấp về phân bón, công chăm sóc và nguyên liệu đầu vào, nên giá thành thấp.

Kỷ nguyên Genomics (Hệ gen học) đang được ứng dụng trên cây đậu tương và ở nhiều cây trồng khác. Gần đây dữ liệu hệ gen học được phát triển dựa trên những thông tin về trình tự các gen trong hệ gen của cây đậu tương [7] và một lượng lớn thông tin về giải mã hệ gen cây đậu tương có thể tìm thấy ở Ngân hàng gen quốc tế. Ngoài ra, nguồn thông tin khác cũng được phát triển, như dữ liệu EST (expressed sequence tag), thư viện cDNA, microarray. Những nguồn thông tin này là cơ hội của việc ứng dụng các tiến bộ chọn giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử và kỹ thuật chuyển gen, là cơ sở của những hiểu biết về chức năng gen trên cơ sở tách dòng gen và phương pháp di truyền ngược. Trên cơ sở đó, nghiên cứu xây dựng một hệ thống chuyển gen ổn định và có hiệu quả ở cây đậu tương là điều cần thiết đi tới thành công trong chiến lược chọn giống đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Hai nhóm phương pháp được ứng dụng trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp. Trong đó, phương pháp

chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen và chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens* đã được ứng dụng phổ biến và thành công đối với cây đậu tương.

Chuyển gen bằng súng bắn gen vào phôi soma đậu tương

Chuyển gen trực tiếp là kỹ thuật chuyển đoạn DNA trực tiếp vào tế bào thực vật với sự giúp đỡ của các phương tiện hóa học hay vật lý, trong đó kỹ thuật chuyển gen bằng súng bắn gen đã được ứng dụng thành công ở cây đậu tương. Chuyển gen bằng súng bắn gen ở thực vật là kỹ thuật dẫn các hạt nhỏ bằng vàng hoặc bằng tungsten được bọc bởi gen chuyển vào tế bào, mô đích [63]. Ưu điểm của phương pháp bắn gen là thao tác dễ dàng, bắn một lần được nhiều tế bào, nguyên liệu để bắn gen đa dạng (hạt phấn, tế bào nuôi cấy, tế bào của các mô biệt hóa và mô phân sinh). Giống đậu tương chuyển gen đầu tiên được tạo ra bằng kỹ thuật sử dụng súng bắn gen từ năm 1988, đến nay phương pháp chuyển gen này đã được cải tiến, phát triển và áp dụng cho hầu hết các giống đậu tương [32], [63] và hàng loạt các công bố về biến nạp thành công trên cây lúa, đu đủ, mía, bông,... những kết quả này đã khẳng định tính ưu việt của phương pháp bắn gen. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là tần số biến nạp còn thấp, cây tạo ra có thể ở dạng thể khảm.

Kể từ khi súng bắn gen được sử dụng lần đầu tiên trên cây đậu tương, kỹ thuật chuyển gen đã đạt được thành công đối với phôi mầm hạt chưa chín [32] và đỉnh mô phân sinh [2]. Phôi soma được tạo ra từ lá mầm non nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 2,4D với nồng độ cao và được sử dụng để tạo ra các phôi mầm có thể tái sinh và tạo cây hoàn chỉnh. Vì quá trình hình thành mô phân sinh phụ thuộc vào kiểu gen cho nên chỉ có một số ít giống đậu tương sử dụng chuyển gen thành công. Căn cứ vào tiềm năng của phôi soma, phôi tăng sinh và tái sinh cây mà giống đậu tương “Jack” được xem là có đủ các đặc tính cần thiết cho chuyển gen và được sử dụng để tạo ra cây đậu tương chuyển gen [54], bởi sự thay đổi quy trình nuôi cấy mô chỉ có thể khắc phục được một phần ảnh hưởng của kiểu gen đến hiệu quả chuyển gen. Phôi soma là một đặc tính di truyền

nhưng cũng có thể cải thiện được nhờ lai giống [38]. Khả năng tạo phôi soma có thể thành công đối với các kiểu gen đậu tương khác nhau [22].

Chuyển gen ở đậu tương nhờ A. tumefaciens lây nhiễm qua rách lá mầm tổn thương

Khác với các phương pháp chuyển gen trực tiếp ở thực vật, phương pháp chuyển gen gián tiếp được thực hiện thông qua vi khuẩn đất *A. tumefaciens*. Đối với cây đậu tương, phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* được ứng dụng từ năm 1988 và hiện nay đã đạt được những thành tựu rất đáng khích lệ [18].

Chuyển gen gián tiếp ở đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* là kỹ thuật bao gồm các bước: (i) Nghiên cứu thu thập thông tin về gen liên quan đến đặc tính, tính trạng quan tâm và phân lập gen; (ii) Thiết kế vector chuyển gen; (iii) Tạo vi khuẩn mang cấu trúc gen chuyển; (iv) Lây nhiễm vào mô tế bào thực vật; (v) Chọn lọc các thể biến nạp và tái sinh cây biến nạp; (vi) Phân tích cây chuyển gen.

Agrobacterium là loài vi khuẩn đất Gram âm gây bệnh khối u ở thực vật và có khả năng lây nhiễm một cách tự nhiên giữa các loài thực vật khác nhau. *Agrobacterium* có thể gây ra bệnh khối u (*A. tumefaciens*) và gây bệnh rễ tơ (*A. rhizogenes*) phổ biến trên nhiều loài thực vật [14]. *A. tumefaciens* chủ yếu lây nhiễm vào thực vật qua các vết thương và do vậy có thể coi *A. tumefaciens* là một công cụ sử dụng để chuyển các gen mong muốn vào cây đậu tương. Ưu điểm của phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* là đơn giản, quen thuộc và yêu cầu tối thiểu về dụng cụ, dễ dàng chuyển một gen đơn lẻ vào cây chủ hoặc chỉ cần số bản copy thấp [15]. Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở đậu tương trong môi trường đồng nuôi cấy được tiến hành trên rách lá mầm [18] mà khởi nguồn phương pháp này dựa vào kiểu gen đậu tương mầm cảm với *A. tumefaciens* và khả năng tái sinh cây từ rách lá mầm. Rách lá mầm là phần nối giữa lá mầm và thân chứa các tế bào mầm có khả năng phát sinh chồi và tăng sinh

trong môi trường nuôi cấy chứa cytokinin. Mức độ hình thành chồi ở nách lá mầm phụ thuộc vào loại cây sử dụng chuyển gen.

Những cây đậu tương chuyển gen đầu tiên mang cấu trúc gen *npII* đã sử dụng kháng sinh kanamycin làm chất chọn lọc và đến nay các dòng tế bào chuyển gen đã sử dụng các chất chọn lọc bởi sự kết hợp gen bar và glufosinate. Nồng độ chất chọn lọc có ảnh hưởng lớn đối với tần suất chuyển gen [67], vì thế phương pháp lựa chọn chất chọn lọc là khác nhau giữa các kiểu gen đậu tương. Các giống có thời gian sinh trưởng ngắn có thể sử dụng để phát triển các dòng đậu tương chuyển gen. Zeng và đtg (2004) cho rằng, hiệu suất chuyển gen có thể đạt từ 0,2% đến khoảng 10% và hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào kỹ thuật và kiểu gen của đậu tương [67]. Ở Mỹ, cây đậu tương chuyển gen chủ yếu được tạo ra từ phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* qua nách lá mầm và các các giống đậu tương chuyển gen được cung cấp bởi các cơ sở nghiên cứu do chính phủ quản lý, bao gồm Trung tâm Plant Transformation Facility thuộc Đại học Iowa State, Trung tâm Plant Transformation Core Facility thuộc Đại học Missouri [63]. Điều này đã gợi ý sự cần thiết và kinh nghiệm tổ chức và quản lý chặt chẽ quá trình nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương ở các quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam.

Phân tích cây đậu tương chuyển gen

Kỹ thuật chuyển gen ở thực vật nói chung và chuyển gen ở cây đậu tương nói riêng được hiểu đầy đủ là: (i) gen ngoại lai (gen chuyển) phải được hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ; (ii) gen chuyển phải được biểu hiện ở tế bào chủ; (iii) gen chuyển phải được di truyền cho các thế hệ sau; (iv) trong mỗi thế hệ sản phẩm của gen chuyển phải được biểu hiện, và (v) sản phẩm của gen chuyển biểu hiện được chức năng sinh học. Chính vì vậy quá trình chọn lọc, phân tích cây chuyển gen trong mỗi thế hệ được thực hiện bằng hệ thống chọn lọc tế bào và mô chuyển gen, xác định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào cây chủ, kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển

thông qua xác định sản phẩm biểu hiện là mRNA, protein và phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển.

Trên nguyên tắc gen chuyển khi được biến nạp có thể tồn tại trong tế bào chủ ở ba trạng thái: (1) tạm thời ở dạng DNA tự do; (2) lâu dài dưới dạng một thể plasmid độc lập và (3) ổn định như một đoạn DNA của hệ gen tế bào chủ và được nhân lên trong tế bào chủ. Phương pháp sinh học phân tử đã được ứng dụng nhằm xác định sự có mặt, sự di truyền và sự biểu hiện của gen chuyển trong tế bào chủ. Có thể sử dụng PCR để phân tích cây chuyển gen, tuy nhiên phương pháp lai Southern blot xác định số bản sao trong cây chuyển gen là phương pháp tin cậy và thông dụng nhất, xác định được sự hợp nhất của gen chuyển vào hệ gen của tế bào chủ. Gần đây, một kỹ thuật thường sử dụng để hỗ trợ cho lai Southern blot trong việc phát hiện số bản sao trong cây chuyển gen là *Quantitative real-time PCR* (qPCR) hoặc *Quantitative real-time RT-PCR* (qRT-PCR). qPCR và qRT-PCR có thể tiến hành với số lượng cây cần phân tích nhiều, dễ thực hiện, tiết kiệm nguyên liệu chi phí và công sức.

Biểu hiện gen là quá trình hoạt động của gen để tạo ra sản phẩm cuối cùng là protein. Quá trình biểu hiện gen được thể hiện qua hai giai đoạn: (1) Phiên mã từ DNA sang mRNA và (2) Dịch mã từ mRNA tổng hợp các phân tử protein thông qua bộ máy ribosome. Để xác định sự có mặt của sản phẩm phiên mã có thể sử dụng kỹ thuật RT-PCR, real-time RT-PCR, lai Northern blot. Đối với các bệnh do virus ở thực vật người ta có thể sử dụng kỹ thuật real-time RT-PCR để đánh giá cây chuyển gen kháng virus thông qua phiên mã để phát hiện và định lượng virus trên cây nhiễm bệnh [49]. Để đánh giá sự có mặt của protein tái tổ hợp do gen chuyển tạo ra có thể thực hiện một số kỹ thuật khác nhau như kỹ thuật Western blot, ELISA và các kỹ thuật phát hiện hoạt động của protein (hoặc enzyme).

Định hướng ứng dụng và thành tựu nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương

Hiện nay, hướng nghiên cứu tiếp cận ứng dụng kỹ thuật chuyển gen vào

việc cải thiện các thành phần hóa sinh trong hạt đậu tương đã đạt được một số thành tựu, như cải thiện hàm lượng và chất lượng protein, cải thành phần dầu, vitamin, nâng cao hàm lượng isoflavone, saponin ...

Tiếp cận kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện tính kháng đối với các tác nhân hữu sinh và vô sinh được thực hiện theo các hướng như sau:

Tăng cường khả năng kháng thuốc diệt cỏ

Thành công nhất trong chuyển gen ở đậu tương là tạo ra giống kháng thuốc diệt cỏ (N-phosphonomethyl-glycine; Roundup) [37]. Giống đậu tương chuyển gen Roundup Ready được thương mại hóa từ năm 1996 và được trồng ở hầu hết các vùng trồng đậu tương kể từ năm 2004 [63]. Gen 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase đã được chuyển vào đậu tương làm tăng khả năng chịu glyphosate ở mức độ cao (glyphosate là chất ngăn chặn hoạt động của enzyme, xúc tác tổng hợp amino acid thơm) [39]. Ngoài ra, việc chuyển gen acetohydroxyacid synthase phân lập từ *Arabidopsis*, gen 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase phân lập từ *Pseudomonas fluorescens*, gen phosphinothricin N-acetyltransferase phân lập từ vi khuẩn đất đã tăng cường khả năng chống chịu các chất imazapyr, isoxaflutole và phosphinothricin trong thuốc diệt cỏ [22].

Tăng cường khả năng kháng côn trùng và vi sinh vật

Protein tinh thể có tác dụng diệt côn trùng (cry hoặc δ -endotoxin) là protein hoạt tính độc tố của *Bacillus thuringiensis* (Bt), một loại thuốc trừ sâu sinh học [51]. Biểu hiện của gen *cry Bt* ở đậu tương đã được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc kiểm soát côn trùng gây bệnh [46] và kháng lại các loại bướm đã được kiểm chứng trên thực địa [59]. Tuy nhiên, việc phát hiện côn trùng có thể thích ứng với protein *cry Bt* đã gây nên mối lo ngại về việc sử dụng lâu dài và liều lượng cao *cry Bt* [32]. Giải pháp cho vấn đề này là sự kết hợp gen *cry Bt* với gen mã hóa protein diệt côn trùng khác để chuyển vào cây đậu tương [69].

Sản xuất đậu tương trên thế giới đã đạt được những thành tựu đáng kể về

năng suất và sản lượng, tuy nhiên ở nhiều vùng sản xuất đậu tương còn có hạn chế về năng suất, chất lượng do các tác nhân gây bệnh, như sâu bệnh, vi khuẩn, virus [17]. Bệnh khảm ở cây đậu tương do SMV gây ra là loại bệnh làm thiệt hại lớn cho ngành sản xuất đậu tương, rệp là vector truyền SMV. Đã có một số nỗ lực lớn để cải thiện tính kháng SMV ở cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen [13]. Ngoài ra khả năng kháng virus gây bệnh đốm quả và gây bệnh lùn ở cây đậu tương cũng được cải thiện bằng kỹ thuật chuyển gen [55].

Tăng cường khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh

Hạn hán là yếu tố ngoại cảnh bất lợi làm giảm năng suất và sản lượng cây trồng. Cây đậu tương chuyển gen mã hóa *P5CR L-Δ¹-pyrroline-5-carboxylate reductase* xúc tác cho phản ứng tổng hợp poline, dưới sự điều khiển của promoter sốc nhiệt đã làm tăng khả năng chịu hạn và chịu nóng cao hơn cây đối chứng (DeRonde et al., 2004). Cũng hướng nghiên cứu này, Nguyễn Thị Thúy Hường và đtg (2011) đã tạo được cây đậu tương chuyển gen chứa gen mã hóa enzyme *P5CS* [34]. Hơn nữa, sự biểu hiện của gen mã hóa chất môi giới phân tử liên quan đến tính chống chịu ở đậu tương (*soyBiPD*) đã làm chậm quá trình lão hóa của các tế bào lá đậu tương trong thời gian bị hạn [57].

2.1.4. Nghiên cứu biểu hiện nhân tố phiên mã *GmDREB*

Hiện nay, kỹ thuật di truyền là một công cụ mạnh mẽ để phát triển các loại cây trồng chuyển gen chịu hạn và chịu mặn, cho phép thay đổi mức độ biểu hiện gen để chống lại stress hạn và muối. Trong bối cảnh này, việc tìm kiếm các gen liên quan đến cơ chế đối phó với tình trạng thiếu nước và nhiễm mặn đã được chứng minh là một nhiệm vụ thiết yếu và cần thiết để phát triển các giống đậu tương chịu hạn và chịu mặn thông qua biến đổi gen. Những tiến bộ trong việc hiểu biểu hiện gen, cơ chế phiên mã và truyền tín hiệu để đáp ứng với hạn và muối của cây trồng đã được công bố [70]. Các yếu tố phiên mã nhận ra các chuỗi DNA trong promoter của gen mục tiêu và do đó điều khiển biểu hiện của chúng. Một cách tiếp cận đã được sử dụng cho mục đích này là kỹ thuật di

truyền của thực vật sử dụng các yếu tố phiên mã (TF). TF điều khiển sự biểu hiện của một số gen đáp ứng với hạn hán và stress muối. Một số nghiên cứu đã đánh giá vai trò của các yếu tố phiên mã trong việc cải thiện khả năng chịu hạn và mặn của cây đậu tương biến đổi gen đã được thực hiện. Đó là, nghiên cứu về đặc điểm của các phản ứng phân tử và sinh lý khi thiếu nước của cây đậu tương biến đổi gen đã biểu hiện quá mức các yếu tố phiên mã AtAREB1; phân tích cây đậu tương chuyển gen *GmMYB84* và các mô hình hoạt động phối hợp được đề xuất giữa MYB84, H₂O₂ và các enzyme chống oxy hóa để kiểm soát sự phát triển của rễ trong điều kiện hạn hán và muối [61]. Các DREB ở đậu tương thuộc họ AP2 là một yếu tố phiên mã hoạt động liên kết với trình tự *cis* của promoter để kích hoạt sự biểu hiện của gen mục tiêu trong đậu tương khi có tín hiệu stress phi sinh học từ ngoại cảnh [8], [42]. Miền AP2 có khoảng 58 hoặc 59 axit amin, bao gồm một số axit amin liên kết với yếu tố phản ứng mất nước (DRE) hoặc hộp GCC [52]. Gần đây, nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự biểu hiện mạnh protein DREB đã tăng khả năng chịu đựng áp lực phi sinh học trong điều kiện đồng ruộng [12]. Đánh giá khả năng chịu hạn của các cây đậu tương biến đổi gen DREB1A và DREB2A đã rút ra nhận xét rằng cây biến đổi gen DREB có tỷ lệ sống cao hơn so với cây không biến đổi gen trong điều kiện thiếu nước nghiêm trọng ở cả điều kiện nhà kính và đồng ruộng [33]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa tìm thấy bất kỳ nghiên cứu nào về sự biểu hiện quá mức của gen *GmDREB6* làm tăng hàm lượng proline và tăng khả năng chịu đựng stress hạn và stress muối ở cây đậu tương chuyển gen.

Gen *GmDREB6* trong cấu trúc *35S-GmDREB6-cmyc* có chiều dài 741 bp, nó được thiết kế và tổng hợp dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập được mang mã là EF551166.1 trên GenBank [26]. Cụ thể là gen *GmDREB6* có chiều dài 693 bp, có thêm đoạn nucleotide có chiều dài 33 bp và 15 bp cho vị trí cắt của enzyme *XbaI* và *SacI*. Gen *GmDREB6* được sử dụng làm gen chuyển và chèn vào vec tơ chuyển gen pBI121 với promoter 35S.

2.1.5. Tình hình nghiên cứu tạo cây đậu tương biến đổi gen ở Việt Nam

Nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương qua *Agrobacterium* được Trần Thị Cúc Hòa (2007) tiến hành thử nghiệm trên 4 phương pháp lây nhiễm khác nhau, trong đó tạo vết thương tại mặt trong của nách lá mầm với dung dịch có chứa vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 21°C là có hiệu quả, với tỷ lệ chuyển gen đạt hiệu suất cao [72]. Nguyễn Thị Thúy Hương (2009) đã tối ưu quy trình tái sinh và chuyển gen thông qua nách lá mầm đậu tương và nhận xét rằng, giống đậu tương DT84 là đối tượng phù hợp để tiến hành các thí nghiệm chuyển gen và đã chuyển thành công cấu trúc gen RD29A/P5CSm vào giống đậu tương DT84, tạo được cây đậu tương mang gen đột biến loại bỏ ức chế phản hồi làm tăng cường khả năng tổng hợp prolin khi cây đậu tương bị hạn [34]. Nguyễn Thu Hiền (2011) đã thành công tái sinh đa chồi từ nách lá mầm hạt chín của 2 giống đậu tương DT12 và DT84 và thử nghiệm chuyển được gen *gus*, hiệu suất chuyển gen kiểm tra ở giai đoạn hạt khoảng 7,6% ở giống DT12 và 4,0 % với giống DT84. Kết quả đã tạo được 8 dòng đậu tương ở thế hệ T1 mang cấu trúc vector biểu hiện đặc trưng trong hạt SLHEP-HA1, dương tính với phản ứng PCR sang thế hệ T2 dòng đậu tương H11 mang đoạn gen *HAI* nhận được đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp HA1 trong hạt của dòng đậu tương này [71]. Tiếp theo là những nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen kháng virus SMV, BYMV của Lò Thị Mai Thu và cộng sự (2014) [75], nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong tạo dòng đậu tương chuyển gen có bộ rễ phát triển của Lò Thanh Sơn và cộng sự (2015) [76].

Hiện nay, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở đậu tương nhằm hướng tới tìm kiếm chức năng một số gen mới và cải thiện khả năng chống chịu các stress sinh học (biotic stress) và phi sinh học (abiotic stress) từ ngoại cảnh nhằm ứng phó với biến đổi khí hậu được nhóm nghiên cứu đặc biệt quan tâm.

2.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

2.2.1. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa nhân tố phiên mã GmDREB6

2.2.1.1. Tách dòng và phân tích đặc điểm gen GmDREB6 từ giống đậu tương DT2008

Thiết kế cặp mồi DREB6-F/DREB6-R, nhân bản gen GmDREB6

Bằng công cụ Tin sinh học, dựa trên bản đồ gen đậu tương đã xác định được gen *GmDREB6* có vị trí trên NST số 5 (LOC100101914). Khảo sát đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* trên GenBank đã xác định được hai trình tự gen mang mã số EF551166 và NM_001248412.2. Trình tự gen mang mã số EF551166 và NM_001248412.2 chứa đoạn mã hóa có 693 bp, mã hóa 230 amino acid. Chúng tôi chọn trình tự mang mã số EF551166 cho thiết kế cặp mồi *DREB6-F/DREB6-R* cho PCR nhân bản đoạn mã hóa của gen *GmDREB6*. Cặp mồi PCR nhân bản gen *GmDREB6* được thiết kế có trình tự nucleotide là:

DREB6-F: 5' – ATGGTCATGGAAGAATCTAAC - 3'

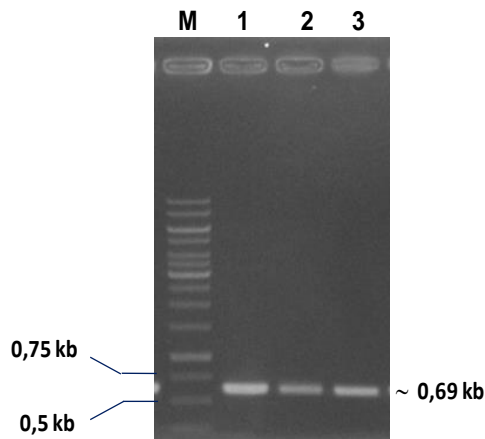
DREB6-R: 5' - TTAATATGATTCCCATAGA -3'

Đoạn DNA được nhân bản dự kiến có kích thước là 693 bp. Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide của cặp mồi *DREB6-F/DREB6-R* được thực hiện bằng phần mềm BioEdit.

Mẫu lá non thu từ giống đậu tương giống DT2008 được sử dụng để tách chiết RNA tổng số bằng KIT Trizol Reagents. RNA tổng số được kiểm tra bằng điện di. RNA tổng số của đậu tương DT2008 sau khi xử lý bằng DNase được sử dụng để tổng hợp cDNA. Sử dụng KIT SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis, bằng phản ứng phiên mã ngược từ RNA tổng số tạo được cDNA làm nguyên liệu cho PCR nhân bản gen *GmDREB6*.

Kết quả nhân bản gen GmDREB6

Từ cDNA, bằng PCR với cặp mồi *DREB6-F/DREB6-R* đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* đã được khuếch đại. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmDREB6* được thể hiện trên hình 2.1.



Hình 2.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmDREB6* (cDNA) từ mRNA của giống đậu tương DT2008. M: Thang DNA 1 kb; 1, 2, 3: gen *GmDREB6*

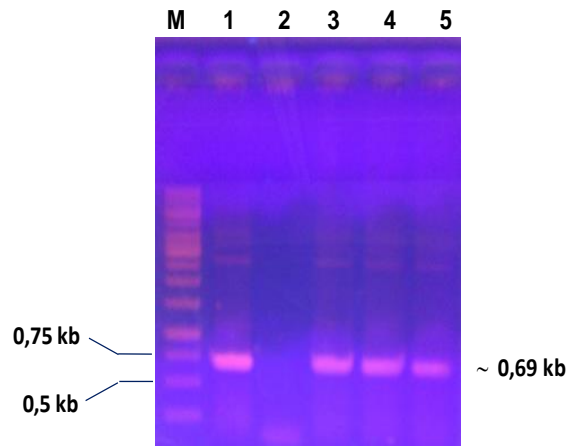
Kết quả nhân gen trên hình 2.1 cho thấy, sản phẩm PCR khuếch đại đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* thu được bằng đặc hiệu với kích thước khoảng 0,69 kb, đúng như tính toán theo lý thuyết. Như vậy, bước đầu đã xác nhận rằng, gen *GmDREB6* được khuếch đại thành công từ RNA tổng số của giống đậu tương DT2008. Sản phẩm PCR thu được được tinh sạch trực tiếp và sử dụng để tách dòng gen.

Tách dòng và giải trình tự gen GmDREB6 từ giống đậu tương DT2008

Kết quả tách dòng gen *GmDREB6*

Sản phẩm PCR đoạn gen *GmDREB6* đã tinh sạch được sử dụng cho phản ứng gắn nối vào vector *pBT* (kích thước 2705 bp) để tạo vector tái tổ hợp *pBT-GmDREB6*. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α , các khuẩn lạc mang vector được chọn lọc trên môi trường kháng sinh Ampicillin, có chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal.

Năm dòng khuẩn lạc trắng được lựa chọn để tiến hành phản ứng colony-PCR kiểm tra sự có mặt của gen *GmDREB6* trong *E.coli*. Kết quả điện di kiểm tra phản ứng colony-PCR được thể hiện trên hình 3.4.



Hình 2.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen *GmDREB6* từ 5 dòng khuẩn lạc màu trắng. M: Thang DNA 1 kb; Giếng 1, 3, 4, 5: sản phẩm colony-PCR; Giếng 2: không có sản phẩm colony-PCR

Theo kết quả thể hiện trên hình 2.2, các khuẩn lạc 1, 3, 4, 5 cho kết quả dương tính với phản ứng colony-PCR, sản phẩm PCR thu được một băng có kích thước như dự kiến là khoảng 0,69 kb. Khuẩn lạc số 2 không xuất hiện cho kết quả âm tính với phản ứng colony-PCR. Các dòng khuẩn lạc cho kết quả dương tính với phản ứng colony-PCR được nuôi tăng sinh và sử dụng để tách chiết plasmid phục vụ giải trình tự nucleotide.

Kết quả giải trình tự gen *GmDREB6* từ giống đậu tương DT2008

Kết quả giải trình tự đoạn DNA từ plasmid tái tổ hợp *pBT-GmDREB6* trên thiết bị tự động thu được trình tự nucleotide có kích thước 693 bp. Để khẳng định đoạn DNA đã đọc trình tự nucleotide là đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* chúng tôi tiến hành phân tích trực tuyến bằng phần mềm BLAST trong NCBI, kết quả thu được ở hình 2.3.

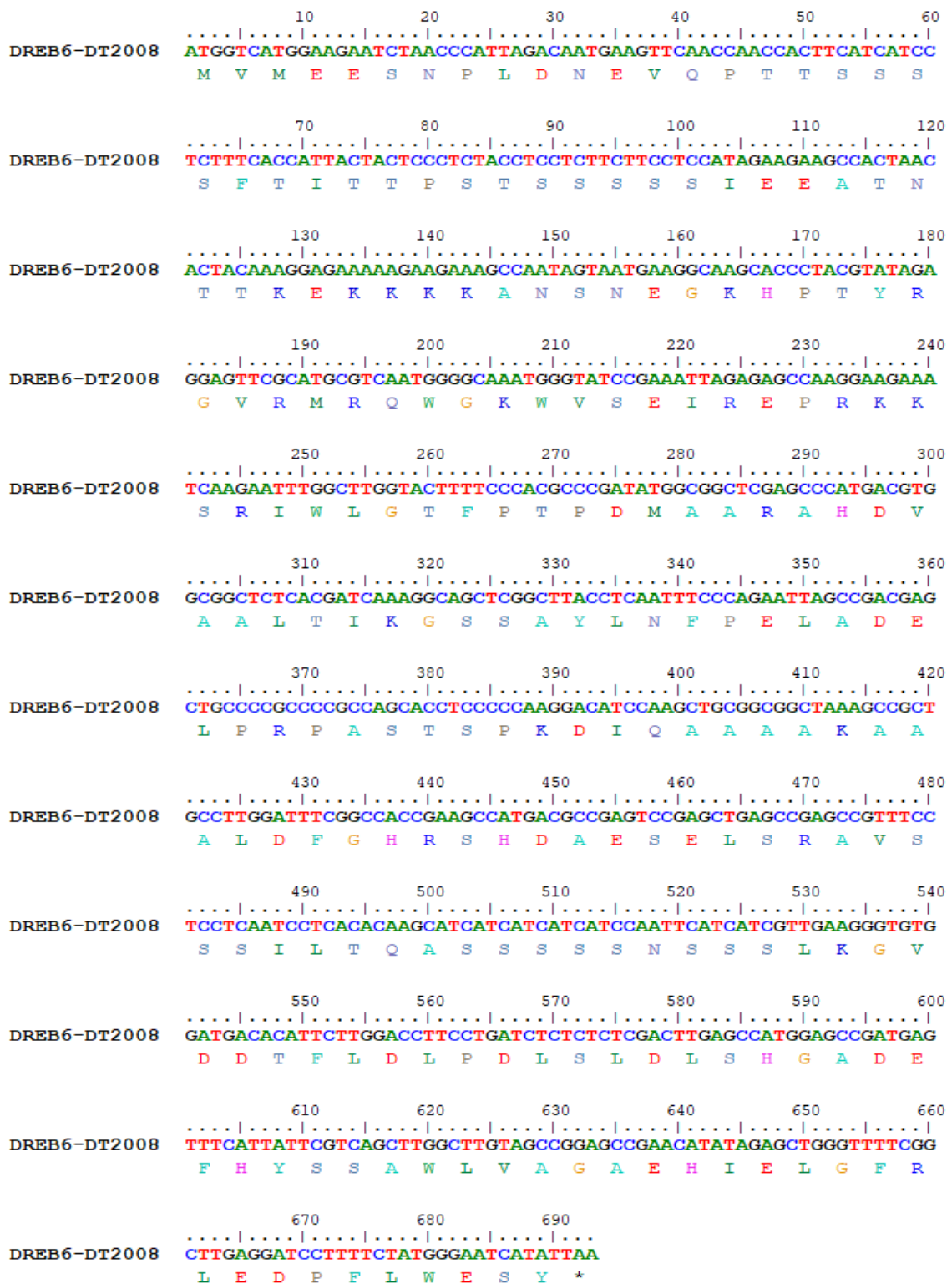
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Glycine max dehydration-responsive element binding protein 6 (LOC100101914), mRNA	1280	1280	100%	0.0	100%	NM_001248412.2
<input type="checkbox"/>	Glycine max dehydration-responsive element binding protein 6 mRNA, complete cds	1280	1280	100%	0.0	100%	EF551166.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Glycine max ethylene-responsive transcription factor ERF039 (LOC100812293), mRNA	1064	1064	100%	0.0	94%	XM_003549877.4
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Cajanus cajan ethylene-responsive transcription factor ERF038-like (LOC109809368), mRNA	693	693	88%	0.0	88%	XM_020372653.1

Hình 2.3. Kết quả phân tích BLAST gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008

Hình 2.3 cho thấy, trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 có độ tương đồng 100% so với hai trình tự gen mang mã số NM_001248412.2 và EF551166. Kết quả phân tích BLAST cho phép khẳng định đoạn gen phân lập từ giống đậu tương DT2008 là gen *Glycine max* dehydration-responsive element binding protein 6 (*GmDREB6*) mRNA của cây đậu tương. Trình tự đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* có kích thước 693 bp mã hóa 230 amino acid (Hình 2.4).



Hình 2.4. Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008

Đặc điểm của trình tự gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008

So sánh trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 với trình tự EF551166 và NM_001248412.2 trên GenBank

Tiến hành so sánh trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 với gen *GmDREB6* mang mã số trên GenBank là EF551166 và NM_001248412.2, kết quả được thể hiện trên hình 2.5 và bảng 2.1.

	10	20	30	40	50
EF551166	ATGGTCATGG	AAGAATCTAA	CCCATTAGAC	AATGAAGTTC	AACCAACCAC
NM_001248412.2
DREB6-DT2008TT
	60	70	80	90	100
EF551166	TTCATCATCC	TCTTTCACCA	TTACTACTCC	CTCTACCTCC	TCTTCTTCCT
NM_001248412.2
DREB6-DT2008	AA.....A
	110	120	130	140	150
EF551166	CCATAGAAGA	AGCCACTAAC	ACTACAAAGG	AGAAAAAGAA	GAAAGCCAAT
NM_001248412.2
DREB6-DT2008
	160	170	180	190	200
EF551166	AGTAATGAAG	GCAAGCACCC	TACGTATAGA	GGAGTTCGCA	TGCGTCAATG
NM_001248412.2
DREB6-DT2008T
	210	220	230	240	250
EF551166	GGGCAAATGG	GTATCCGAAA	TTAGAGAGCC	AAGGAAGAAA	TCAAGAATTT
NM_001248412.2
DREB6-DT2008
	260	270	280	290	300
EF551166	GGCTTGGTAC	TTTTCCCACG	CCCGATATGG	CGGCTCGAGC	CCATGACGTG
NM_001248412.2
DREB6-DT2008
	310	320	330	340	350
EF551166	GCGGCTCTCA	CGATCAAAGG	CAGCTCGGCT	TACCTCAATT	TCCCAGAATT
NM_001248412.2
DREB6-DT2008CC
	360	370	380	390	400
EF551166	AGCCGACGAG	CTGCCCGGCC	CCGCCAGCAC	CTCCCCCAAG	GACATCCAAG
NM_001248412.2
DREB6-DT2008

```

          410          420          430          440          450
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  CTGCGGCGGC TAAAGCCGCT GCCTTGGATT TCGGCCACCG AAGCCATGAC
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                .....CC.....

          460          470          480          490          500
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  GCCGAGTCCG AGCTGAGCCG AGCCGTTTCC TCCTCAATCC TCACACAAGC
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          510          520          530          540          550
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  ATCATCATCA TCATCCAATT CATCATCGTT GAAGGGTGTG GATGACACAT
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          560          570          580          590          600
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  TCTTGGACCT TCCTGATCTC TCTCTCGACT TGAGCCATGG AGCCGATGAG
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                .....A A.....

          610          620          630          640          650
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  TTTCAATTATT CGTCAGCTTG GCTTGTAGCC GGAGCCGAAC ATATAGAGCT
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                .....GG.....

          660          670          680          690
EF551166      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
NM_001248412.2  GGGTTTTCGG CTTGAGGATC CTTTTCTATG GGAATCATAT TAA
DREB6-DT2008  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                .....C C.....

```

Hình 2.5. So sánh trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự gen *GmDREB6* mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank

Bảng 2.1 và hình 2.5 cho thấy, trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 có 16 vị trí nucleotide sai khác so với trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* mang mã số EF551166 và NM_001248412 trên GenBank, đó là các vị trí 19, 20, 51, 52, 75, 197, 319, 320, 408, 409, 580, 581, 635, 636, 680, 681. Tất cả những sai khác này đều là sự thay thế cặp A-T bằng G-C hoặc G-C bằng A-T. Vấn đề đặt ra là sự thay thế cặp nucleotide có làm thay

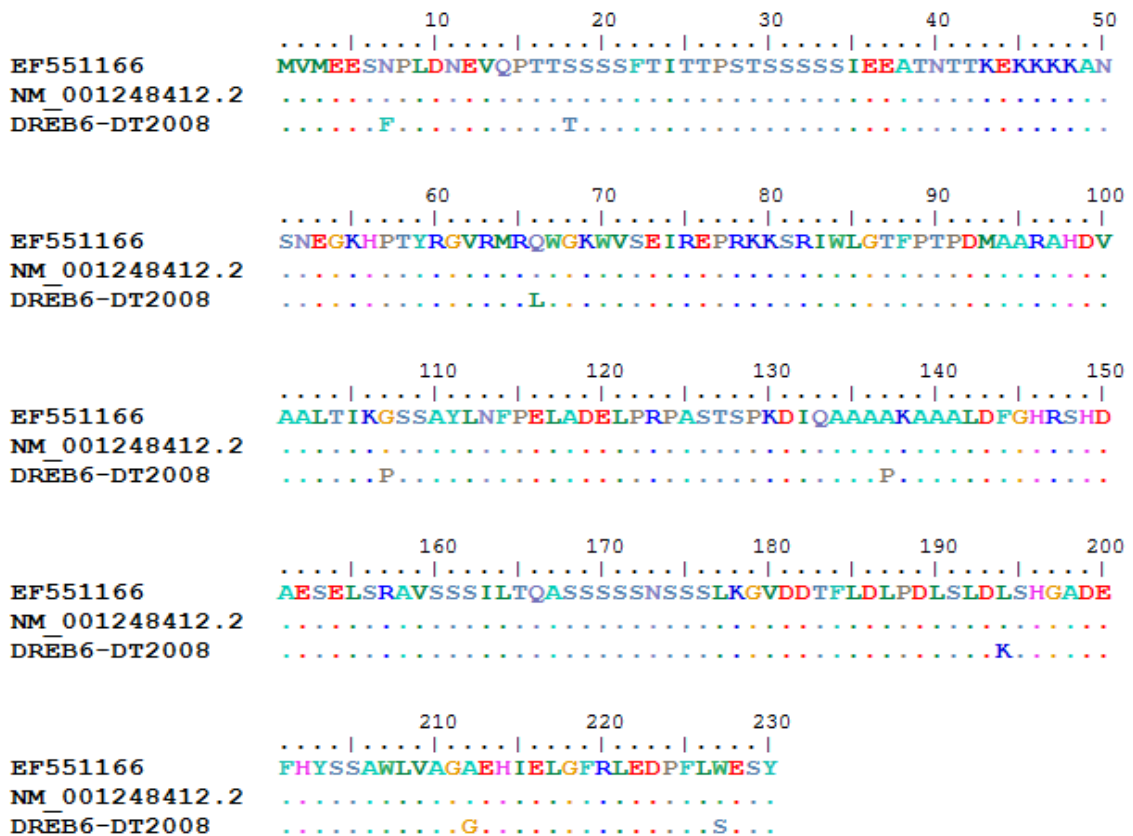
đổi amino acid hay không cần phải tiến hành so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6*.

Bảng 2.1. Các vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự mang mã số EF551166, NM_001248412.2

TT	Vị trí nucleotide	DT2008	EF551166	NM_001248412.2
1	19	T	A	A
2	20	T	A	A
3	51	A	T	T
4	52	A	T	T
5	75	A	T	T
6	197	T	A	A
7	319	C	G	G
8	320	C	G	G
9	408	C	G	G
10	409	C	G	G
11	580	A	T	T
12	581	A	T	T
13	635	G	C	C
14	636	G	C	C
15	680	C	G	G
16	681	C	G	G

So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* của giống DT2008 với trình tự amino acid suy diễn của EF551166 và NM_001248412 trên GenBank

Hình 2.6 và bảng 2.2 trình bày kết quả so sánh sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và hai trình tự gen *GmDREB6* mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank.

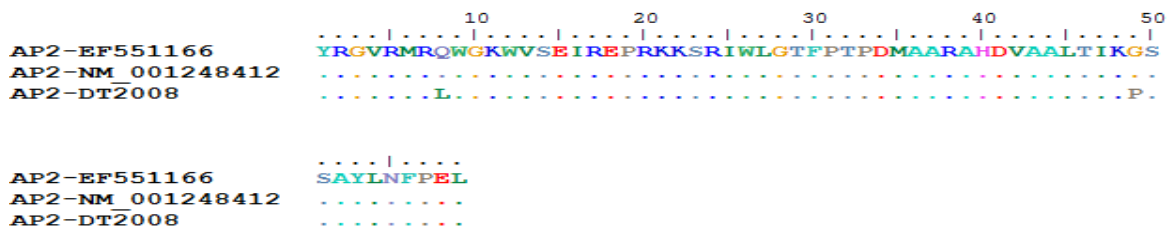


Hình 2.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và của trình tự gen DREB6 mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank

Hình 2.6 và bảng 2.2 cho thấy, trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự amino acid suy diễn từ gen *GmDREB6* mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank có 8 vị trí amino acid sai khác, đó là các vị trí 6, 18, 66, 107, 137, 194, 212, 227. Sự sai khác về trình tự amino acid trong protein suy diễn của gen *GmDREB6* so với hai gen mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank có liên quan gì đến mức độ chống chịu stress hạn của cây đậu tương cần tiếp tục xem xét vùng AP2 và các điểm liên kết với sợi DNA. Kết quả so sánh ở hình 2.7 cho thấy, ở vùng AP2 của protein suy diễn từ gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 có 2 vị trí sai khác, đó là amino acid thứ 66 và 107. Hai điểm sai khác về amino acid không thuộc vào những vị trí DNA binding (60, 61, 63, 65, 67, 69, 73, 75, 82, 84, 87).

Bảng 2.2. Các vị trí sai khác trong trình tự amino acid suy diễn của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 và suy diễn từ trình tự mang mã số EF551166, NM_001248412.2

TT	Vị trí amino acid	DT2008	EF551166	NM_001248412.2
1	7	F	N	N
2	18	T	S	S
3	66	L	Q	Q
4	107	P	G	G
5	137	P	A	A
6	194	K	L	L
7	212	G	A	A
8	227	S	W	W



Hình 2.7. So sánh trình tự amino acid của vùng AP2 trong protein suy diễn từ gen *GmDREB6* của giống đậu tương DT2008 và EF551166, NM_001248412.2 trên GenBank

2.2.2.2. Thiết kế vector chuyển gen *GmDREB6*

Thiết kế và tổng hợp gen GmDREB6

Dựa trên thông tin của gen *GmDREB6* (cDNA) được phân lập từ giống đậu tương DT2008 của Việt Nam như đã trình bày ở trên và gen *GmDREB6* với mã EF551166 trên GenBank (Liu và cs, 2007) [6], gen *GmDREB6* nhân tạo được thiết kế với kích thước 741 bp (Hình 2.8). Gen *GmDREB6* nhân tạo có 693 nucleotide, bổ sung 15 nucleotide là vị trí cắt của cặp enzyme *XbaI*/ *SacI* và 33

nucleotide mã hóa đuôi cmyc, tổng cộng là 741 nucleotide. Gen *GmDREB6* được chèn vào vector pUC18 (*pUC18_GmDREB6*).

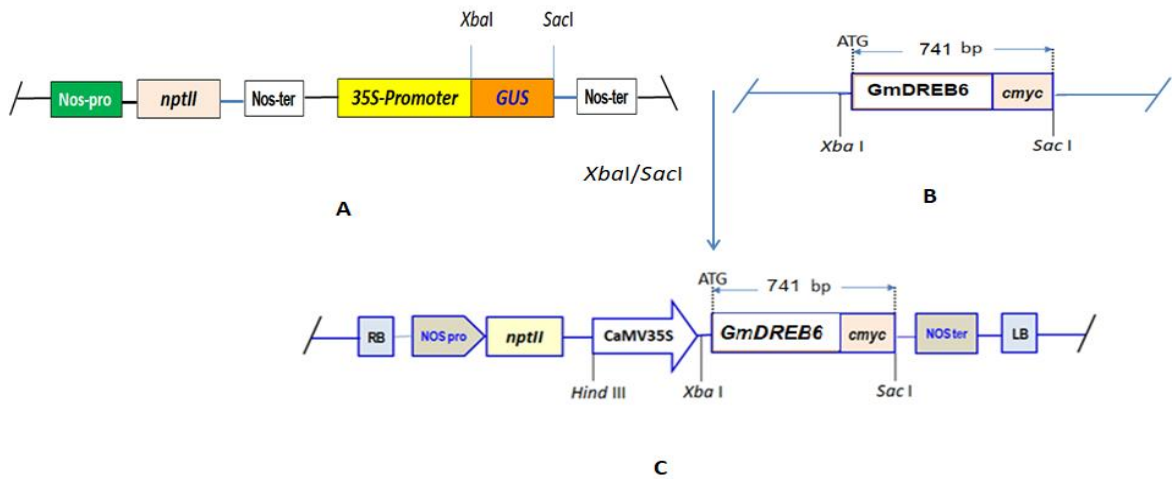
5' gctctagaATGGTCATGGAAGAATCTAACCCATTAGACAATGAAGTTCAACCAACCACTT
 CATCATCCTCTTTTACCATTACTACTCCCTCTACCTCCTCTTCTTCCCTCCATAGAAGAAGC
 CACTAACACTACAAAGGAGAAAAAGAAGAAAGCCAATAGTAATGAAGGCAAGCACCCCTACG
 TATAGAGGAGTTTCGCATGCGTCAATGGGGCAAATGGGTATCCGAAATTAGAGAGCCAAGGA
 AGAAATCAAGAATTTGGCTTGGTACTTTTCCCACGCCCGATATGGCGGCTCGAGCCCATGA
 CGTGGCGGCTCTCACGATCAAAGGCAGCTCGGCTTACCTCAATTTCCCAGAATTAGCCGAC
 GAGCTGCCCCGCCCGCCAGCACCTCCCCAAGGACATCCAAGCTGCGGGCGTCTAAAGCCG
 CTGCCTTGGATTTTCGGCCACCGAAGCCATGACGCCGAGTCCGAGCTGAGCCGAGCCGTTTC
 CTCCTCAATCCTCACACAAGCATCATCATCATCCAATTCATCATCGTTGAAGGGTGTG
 GATGACACATTCTTGGACCTTCTGATCTCTCTCTCGACTTGAGCCATGGAGCCGATGAGT
 TTCATTATTCGTCAGCTTGGCTTGTAGCCGAGCCGAACATATAGAGCTGGGTTTTTCGGCT
 TGAGGATCCTTTTCTATGGGAATCATATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT
 TAAgagctcg 3'

Hình 2.8. Trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* nhân tạo

Ở đầu 5'- gctctaga là trình tự chứa vị trí cắt của *XbaI* và ở đầu gagctcg-3' là trình tự chứa vị trí cắt của *SacI*.

Tạo vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*

Sử dụng cặp enzyme *XbaI/SacI* để loại gen *GUS* từ vector *pBI121_GUS*; đồng thời cũng sử dụng cặp enzyme *XbaI/SacI* để cắt thu nhận gen *GmDREB6* (741 bp) từ vector pUC18. Sử dụng enzyme nối T4 DNA ligase nối gen *GmDREB6* vào vector chuyển gen *pBI121* thành vector *pBI121_GmDREB6* (Hình 2.9).



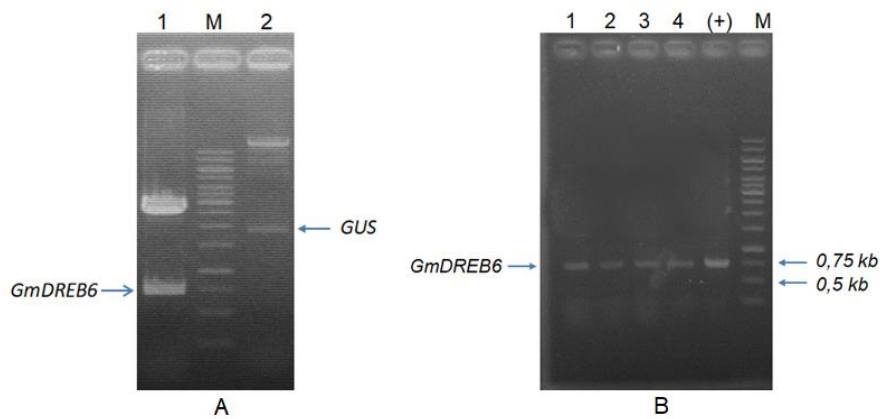
Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*

A: vectơ *pBI121_GUS*; B: vectơ *pUC18_GmDREB6*; C: *pBI121_GmDREB6*;
nptII: neomycin-phospho-transferase II; 35S: virus khảm súp lơ 35S Promer;
GmDREB6-cmyc: gen *GmDREB6* chứa *cmyc* và vị trí cắt của cặp enzyme
XbaI/SacI

Kết quả cắt *pUC18-GmDREB6* để thu được gen *GmDREB6* và loại bỏ gen *GUS* khỏi vectơ *pBI121_GUS* được thể hiện hình 2.10A. Vectơ tái tổ hợp *pBI121_GmDREB6* biến nạp vào *E.coli* DH5 α , được nhân bản và kiểm tra bằng colony-PCR (Hình 2.10B).

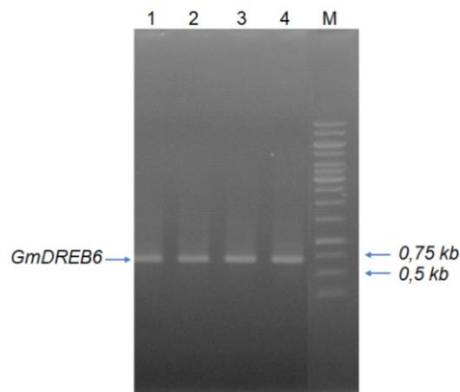
Plasmid *pBI121_GmDREB6* tách chiết từ *E.coli* DH5 α đã được chuyển vào *A.tumefaciens*. *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang gen *GmDREB6* đã được nhân dòng và chọn lọc và kiểm tra. Chọn ngẫu nhiên 4 dòng khuẩn lạc và phân tích bằng colony-PCR nhân bản gen *GmDREB6* kết quả cho thấy một băng DNA ứng với kích thước của gen chuyển *GmDREB6* (Hình 2.11).

Các khuẩn lạc *A.tumefaciens* dương tính được lưu giữ và sử dụng để lây nhiễm vào thuốc lá và đậu tương để tạo cây chuyển gen.



Hình 2.10. A- Gel điện di của sản phẩm cắt từ vector *pPU18_GmDREB6* và *pBI121_GUS* với cặp enzyme *SacI/XbaI*

1: *pPU18_GmDREB6*; **M:** thang DNA 1 kb; **2:** *pBI121_GUS*. B- Gel điện di của sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc *E.coli* DH5 α để kiểm tra gen *GmDREB6* trong cấu trúc *pBI121_GmDREB6*. **M:** thang DNA 1 kb; **(+):** Gen *GmDREB6* được khuếch đại từ *pPU18_GmDREB6*; **1, 2, 3, 4:** gen *GmDREB6* được khuếch đại từ các khuẩn lạc *E.coli* DH5 α .



Hình 2.11. Hình ảnh điện di kiểm tra gen chuyển *GmDREB6* bằng colony-PCR từ các khuẩn lạc *A.tumefaciens* AGL1. **M:** thang DNA 1 kb; **1, 2, 3, 4:** các dòng khuẩn lạc của chủng *A.tumefaciens* AGL1.

Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* được thiết kế và tổng hợp có kích thước 741 bp, mã hóa 230 amino acid và đoạn nucleotide mã hóa kháng nguyên cmyc để kiểm tra sự hiện diện của protein *GmDREB6* tái tổ hợp trong cây chuyển gen. Gen chuyển *GmDREB6* được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen thực vật. Cấu trúc *35S-GmDREB6-cmyc* trong vector chuyển gen *pBI121* được thiết kế thành công và tạo được các dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* AGL1 tái tổ hợp mang gen chuyển *GmDREB6*. Dòng vi khuẩn *A.tumefaciens* AGL1 tái tổ hợp được sử dụng chuyển vào cây thuốc lá và cây đậu tương.

2.2.2. Phân tích hoạt động của vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* trên cây thuốc lá

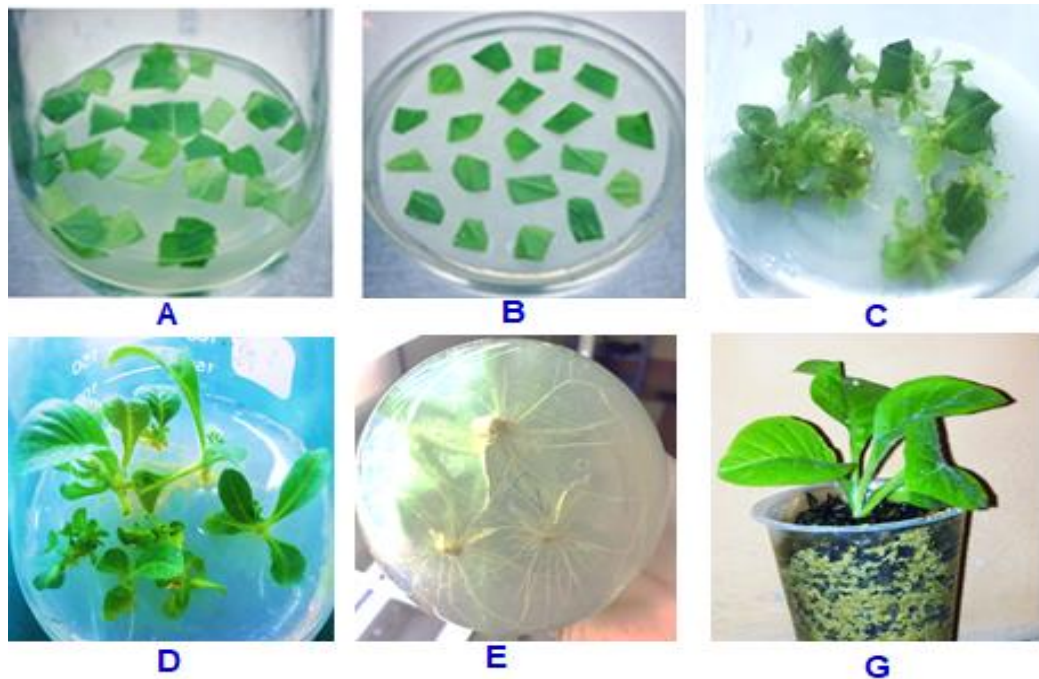
2.2.2.1. Biến nạp cấu trúc *pBI121_GmDREB6* vào thuốc lá

Những mẫu lá thuốc lá có kích thước khoảng 1cm² được nuôi cấy trên môi trường MS trong 48 giờ; sau đó, các mảnh lá được ngâm trong dịch huyền phù *A.tumefaciens* với thời gian 20 phút. Các mảnh lá nhiễm khuẩn được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy, môi trường tái sinh đa chồi, môi trường ra rễ và để tạo ra cây thuốc lá chuyển gen (Hình.2.12).

Từ 180 mẫu trong ba lần biến nạp có 539 chồi được tạo ra trong môi trường tái sinh đa chồi và môi trường kéo dài chồi, có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin, trong đó có 309 chồi sinh trưởng tốt chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả có 101 cây con đã được trồng trên chậu, trong đó 48 cây được chuyển đến nhà lưới.

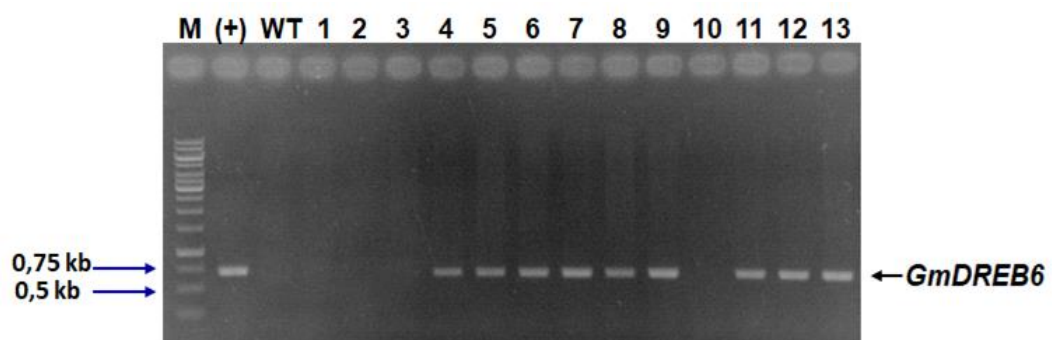
2.2.2.2. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen

Chọn 13 cây chuyển gen sinh trưởng, phát triển tốt đem phân tích sự hiện diện của gen chuyển *GmDREB6* trong cây chuyển gen. Kết quả phân tích PCR với cặp mồi *XbaI-DREB6-F / DREB6-SacI-R* cho kết quả 9 cây dương tính với sự xuất hiện của một băng DNA có cùng kích thước với gen chuyển *GmDREB6* (741 bp) (Hình 2.13). Cây chuyển gen dương tính PCR trong thế hệ T0 được dán nhãn là T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13.



Hình 2.12. Hình ảnh mô tả tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua lây nhiễm *A.tumefaciens* tái tổ hợp vào các mảnh lá thuốc lá

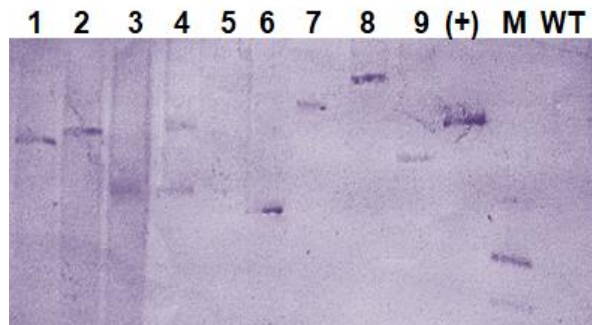
A: Các mảnh lá ngâm trong dịch huyền phù *A.tumefaciens*; B: Các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy; C, D: Tái sinh đa chồi và kéo dài chồi; E: Các chồi trên môi trường ra rễ; (F): Cây thuốc lá chuyển gen được trồng trên giá thể.



Hình 2.13. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển *GmDREB6* từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0

M: thang DNA 1 kb; (+): plasmid *pBI121-GmDREB6*; WT: cây không chuyển gen; 1-13: Các cây chuyển gen thế hệ T0 (T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13).

Kết quả phân tích 9 cây dương tính với PCR bằng Southern blot cho thấy có 8 cây (T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13) cho kết quả lai Southern. Từ kết quả này có thể kết luận rằng, gen chuyển *GmDREB6* đã được hợp nhất vào hệ gen của cây thuốc lá chuyển gen (Hình 2.14).

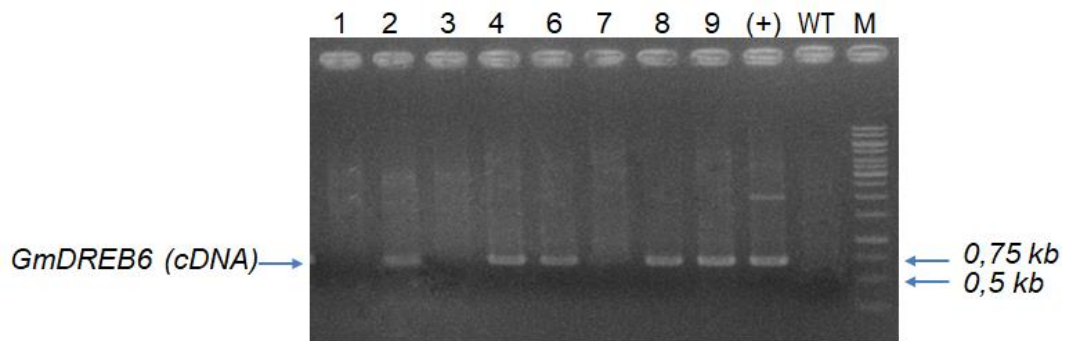


Hình 2.14. Hình ảnh kết quả phân tích Southern blot kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển *GmDREB6* vào hệ gen các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0

M: thang DNA 1 kb; (+): plasmid *pBI121-GmDREB6*; WT: cây không chuyển gen; 1-13: Các cây chuyển gen thế hệ T0 (T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13)

Kết quả phân tích sự biểu hiện ở mức phiên mã của tám cây T0 dương tính với Southern blot bằng phản ứng RT-PCR cho thấy có 5 cây T0 được phiên mã để tạo ra mRNA, đó là: T0-5, T0-7, T0-9, T0-12, T0-13 (Hình 2.15). Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* đã được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen.

Cấu trúc *35S-GmDREB6-cmyc* trong vector tái tổ hợp *pBI121* đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá qua trung gian *Agrobacterium*. Gen chuyển *GmDREB6* được chứng minh là hợp nhất vào bộ gen và được biểu hiện ở cây thuốc lá chuyển gen ở cấp độ phiên mã. Như vậy có thể thấy vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* hoạt động tốt trên các cây thuốc lá mô hình, vì vậy nó có thể sử dụng để chuyển vào cây đậu tương như mục tiêu là tạo cây chuyển gen có khả năng chống chịu các stress phi sinh học.

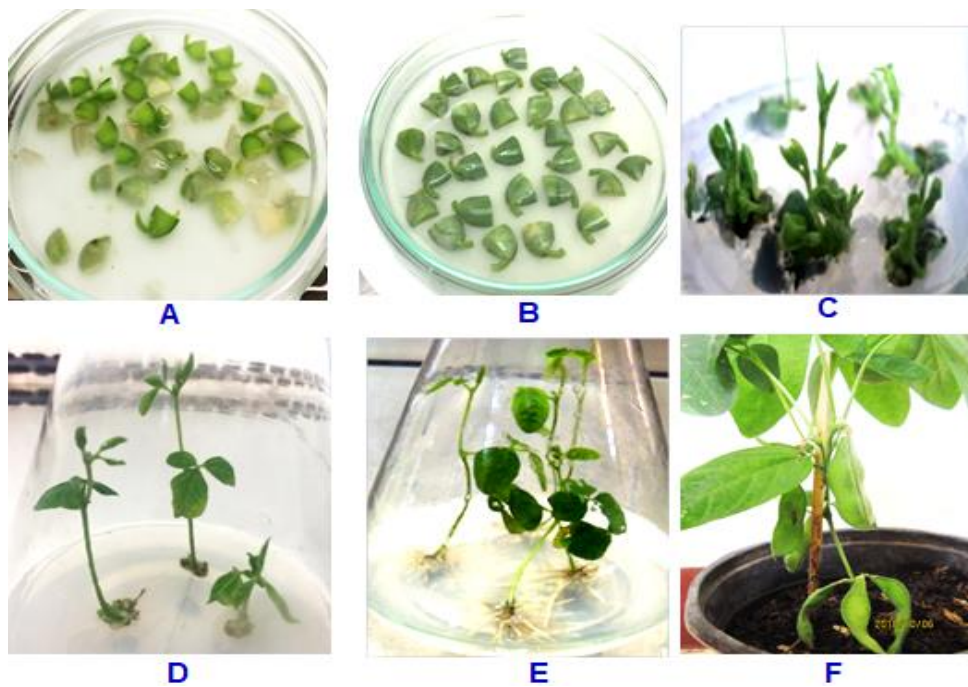


Hình 2.15. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cDNA của gen chuyển *GmDREB6* từ mRNA của các cây chuyển gen T0

M: thang DNA 1kb; (+): plasmid *pBII21-GmDREB6*; WT: cây không chuyển gen; 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9: Các cây thuộc lá chuyển gen dương tính với Southern blot tương ứng là T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13.

2.2.3. Kết quả chuyển gen *GmDREB6* vào đậu tương và tạo cây chuyển gen

Vector *pBII21_GmDREB6* mang cấu trúc *35S-GmDREB6-cmyc* đã được chuyển vào đậu tương bằng cách lây nhiễm bởi *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm (Hình 2.16). Thí nghiệm chuyển gen được lặp lại ba lần, với 150 mẫu cho mỗi lần biến nạp, từ 450 mẫu được chuyển gen đã thu được 10 cây chuyển gen sống sót trên giá thể trong điều kiện nhà lưới. Đối chứng 0 (ĐC0) là các mảnh lá mầm đậu tương không chuyển gen được tái sinh trên môi trường không bổ sung kháng sinh và 8 cây đậu tương không chuyển gen đã được chọn và chuyển ra trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới (Bảng 2.3). Đối chứng 1 (ĐC1) là các mảnh lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường có bổ sung kháng sinh và kết quả là 100% các mảnh lá mầm không tái sinh được chồi.



Hình 2.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh *in vitro* và tạo cây đậu tương chuyển gen

A: Các lá mầm được lây nhiễm bởi *A. tumefaciens* mang vec tơ tái tổ hợp *pBI121_GmDREB6* trong 30 phút;

B: Đồng nuôi cây trong môi trường CCM ở điều kiện tối 5 ngày;

C: Các lá mầm nhiễm khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tái sinh đa chồi SIM trong 2 tuần, bổ sung BAP 2 mg/L và kanamycin 50 mg/L;

D: Lá mầm đã loại bỏ khỏi chồi và chồi được nuôi cấy trên môi trường kéo dài SEM trong 2 tuần, bổ sung GA3 0,5 mg/L, IAA 0,1 mg/L, kanamycin 50 mg/L;

E: Các chồi chuyển gen tái sinh rễ trong môi trường RM, bổ sung IBA 0,1 mg/L trong 20 ngày;

F: Cây con đã được chuyển sang chậu chứa hỗn hợp 1 trấu hun:1 cát trong điều kiện nhà lưới.

Bảng 2.3. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* qua nách lá mầm đậu tương nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*

Đối chứng và thí nghiệm		Tổng số mẫu	Số mẫu tạo chồi	Tổng số chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây trông trên giá thể	Số cây sống sót và phát triển bình thường trong nhà lưới
Thí nghiệm chuyển gen	Lần 1	150	75	196	82	45	21	3
	Lần 2	150	81	185	78	41	19	3
	Lần 3	150	69	178	91	45	25	4
Tổng		450	225	559	251	131	65	10
ĐC0*		30	22	61	30	22	16	8
ĐC1*		30	0	0	0	0	0	0

*Ghi chú: ĐC0** là mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh; *ĐC1** là mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh.

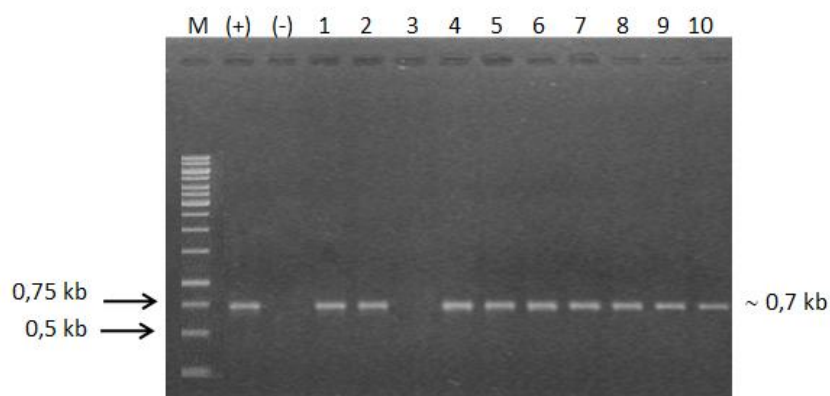
Như vậy từ 450 mẫu biến nạp, qua 3 lần chọn lọc bằng kháng sinh kanamicin, kết quả đã tạo được 10 cây đậu tương chuyển gen sinh trưởng trong nhà lưới.

2.2.4. Phân tích biểu hiện của gen chuyển ở các dòng đậu tương chuyển gen

Các cây đậu tương chuyển gen trong nhà lưới được tiến hành phân tích bằng PCR và Southern blot để khẳng định gen chuyển *GmDREB6* đã được hợp nhất vào hệ gen cây đậu tương. Đồng thời sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB6* được xác nhận ở mức dịch mã tổng hợp protein bằng Western blot.

DNA tổng số được phân lập từ lá non đậu tương dựa trên phương pháp Saghai-Maroust et al và được kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Phân tích PCR đã được sử dụng để xác nhận sự hiện diện của gen chuyển *GmDREB6* trong 10 cây đậu tương chuyển gen. PCR với cặp mồi *XbaI-DREB6-F/ DREB6-SacI-R* được

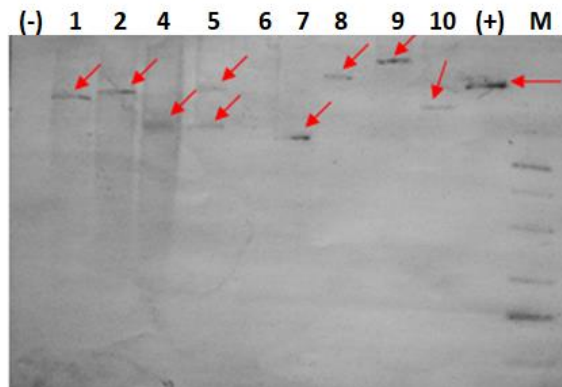
sử dụng để nhân bản gen chuyển *GmDREB6* từ DNA hệ gen của 10 cây đậu tương chuyển gen, kết quả đã thu được sản phẩm là đoạn DNA có kích thước gần 0,75 kb, tương ứng kích thước của gen chuyển *GmDREB6*. Các băng DNA xuất hiện ở 9/10 cây đậu tương chuyển gen. Chín cây đậu tương chuyển gen dương tính PCR ở thế hệ T0 được ký hiệu là T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9 và T0-10. Kết quả này bước đầu đã cho phép nhận xét rằng 9 cây đậu tương chuyển gen có chứa gen chuyển *GmDREB6* (Hình 2.17).



Hình 2.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác nhận sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong các cây đậu tương chuyển gen T0

M: thang DNA 1,0 kb; (+): Vector *pBI121_GmDREB6*; (-): Đậu tương không chuyển gen; 1-10: Cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 được ký hiệu là T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-10.

Tuy nhiên, để chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển *GmDREB6* vào hệ gen của 9 cây đậu tương chuyển gen dương tính với PCR, kỹ thuật Southern blot đã được sử dụng. Kết quả phân tích 9 cây đậu tương chuyển gen ở T0 bằng Southern blot trong hình 2.18 cho thấy các băng DNA xuất hiện ở 8/9 cây đậu tương chuyển gen, trong khi đó không có băng DNA nào ở cây T0-6 và các cây đối chứng không chuyển gen. Cây T0-5 có 2 băng DNA tương ứng với 2 bản copy và các cây còn lại: T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-7, T0-8, T0-9 và T0-10 chỉ có 1 băng DNA (1 bản copy).

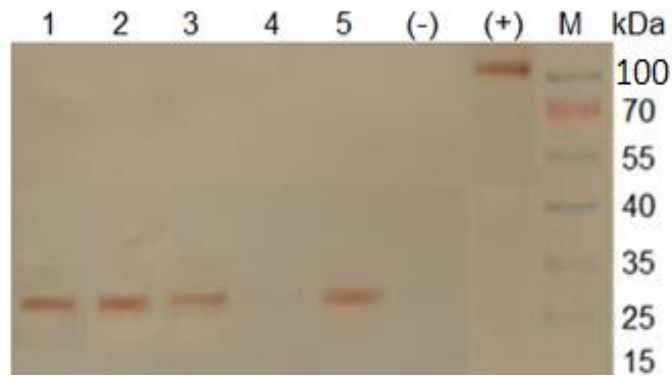


Hình 2.18. Hình ảnh kết quả Southern blot xác nhận sự hợp nhất của gen chuyển GmDREB6 vào hệ gen của cây đậu tương chuyển gen T0

M: Thang DNA 1,0 kb; (+): *pBI121_GmDREB6*; (-): Đậu tương không chuyển gen; 1-10: Các cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0: T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-10.

Trong số 8 cây dương tính với Southern blot ở thế hệ T0, có 5 cây tạo ra hoa, tạo quả và hạt, đó là T0-2, T0-4, T0-7, T0-9, T0-10. Hạt của 5 cây chuyển gen ở thế hệ T0 được cho nảy mầm, sinh trưởng và phát triển thành các dòng chuyển gen T1. Các dòng cây chuyển gen ở thế hệ T1 được ký hiệu là T1-2, T1-4; T1-7, T1-9 và T1-10.

Protein DREB6 tái tổ hợp chứa kháng nguyên cmyc ở đầu C, khác với DREB6 nội sinh, do đó protein DREB6 tái tổ hợp được phát hiện bằng Western blot. Các mẫu lá non từ các dòng chuyển gen ở thế hệ T1 đã được sử dụng để phân tích sự biểu hiện của protein DREB6 tái tổ hợp. Kết quả phân tích Western blot cho thấy một băng protein khoảng 27 kDa tương ứng với khối lượng phân tử của protein DREB6 tái tổ hợp xuất hiện ở bốn dòng chuyển gen T1-2, T1-4, T1-7, T1-10, trong khi đó thấy không có xuất hiện băng protein ở dòng đậu tương T1-9 và cây đậu tương không chuyển gen (Hình 2.19). Kết quả phân tích biểu hiện protein DREB6 tái tổ hợp ở cây đậu tương chuyển gen đã chứng minh gen chuyển GmDREB6 được di truyền từ thế hệ T0 sang thế hệ T1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp DREB6.



Hình 2.19. Kết quả phân tích Western blot xác nhận protein DREB6 tái tổ hợp biểu hiện trong các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1

M: Thang protein tiêu chuẩn; 1-5: các dòng đậu tương chuyển gen T1 (T1-2, T1-4; T1-7, T1-9, T1-10); (-): cây đậu tương không chuyển gen. (+): > 100 kDa protein có gắn peptid c-myc.

2.2.5. Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6*

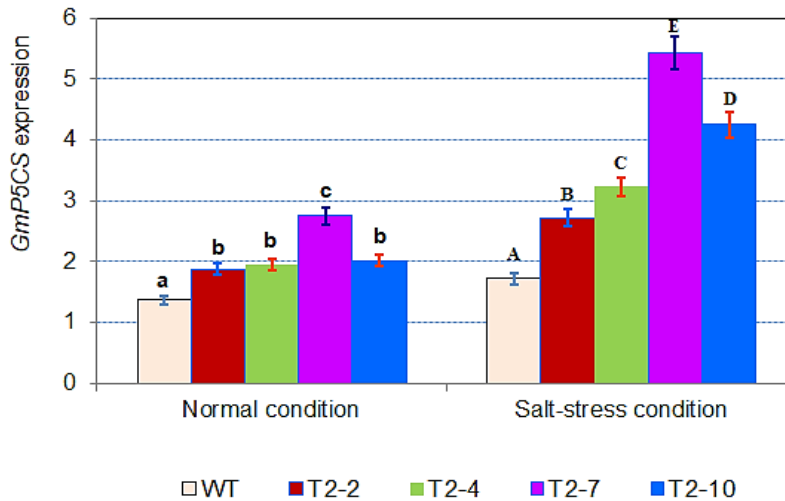
Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển thông qua so sánh sự biểu hiện của gen *GmP5CS* và khả năng tích lũy proline giữa các dòng cây chuyển gen *GmDREB6* ở thế hệ T2 với các cây không chuyển gen trong điều kiện stress NaCl.

Hạt của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 nảy mầm và phát triển thành cây T2, gồm các dòng T2-2, T2-4, T2-7, T2-10 trên giá thể là cát sạch. Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6* thông qua so sánh sự biểu hiện của gen *GmP5CS* và khả năng tích lũy proline giữa các dòng cây chuyển gen *GmDREB6* ở thế hệ T2 với các cây không chuyển gen trong điều kiện stress NaCl ở hai điều kiện stress NaCl 150 mM và NaCl 300 mM.

2.2.5.1. Phân tích sự biểu hiện của gen *GmP5CS* trong các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* và các cây không chuyển gen sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl

Kết quả phân tích bằng phương pháp test Duncan về biểu hiện phiên mã của gen *GmP5CS* cho thấy sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$) giữa các dòng chuyển

gen *GmDREB6* và cây không chuyển gen trong điều kiện bị nhiễm NaCl cũng như điều kiện đủ nước. Các dòng chuyển gen T2 thấy có sự biểu hiện phiên mã của gen *GmP5CS* cao hơn so với các cây không chuyển gen khi xem xét cả điều kiện bình thường và căng thẳng (Hình 2.20).



Hình 2.20. Biểu đồ so sánh mức độ biểu hiện của gen *GmP5CS* phản ứng với stress muối trong bốn dòng cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6* ở T2 và cây không chuyển gen được xác định bằng Real time RT-PCR (qRT-PCR).

Actin (152 bp) đã được sử dụng làm gen tham chiếu. Mức độ biểu hiện của gen *GmP5CS* (165 bp) tăng lên trong các dòng đậu tương chuyển gen so với các cây không chuyển gen.

WT: cây không chuyển gen; T2-2, T2-4, T2-7, T2-10: các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T2. Các chữ cái khác nhau trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$ bằng phương pháp test Duncan. Các dữ liệu trên các cột là giá trị trung bình của ba lần lặp lại \pm sai số chuẩn.

Mức độ biểu hiện của gen *GmP5CS* trong các dòng chuyển gen từ 1,36 đến 2,01 lần (trong điều kiện bình thường) và từ 1,58 đến 3,16 lần (trong điều kiện stress muối), cao hơn so với các cây không chuyển gen. Biểu hiện gen *GmP5CS* cao nhất được phát hiện ở dòng T2-7 và gấp 2,01 lần (trong điều kiện bình thường) và gấp 3,16 lần (trong điều kiện stress muối) so với cây không chuyển

gen. Do vậy, kết quả phân tích qRT-PCR của gen *GmP5CS* đã được chứng minh là biểu hiện tăng đáng kể ($P < 0,05$) trong các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* trong điều kiện bình thường và điều kiện stress muối.

2.2.5.2. Phân tích sự thay đổi hàm lượng proline của dòng đậu tương chuyển gen và các cây đậu tương không chuyển gen sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl

Hạt của các dòng biến đổi gen trong thế hệ T1, T1-2, T1-4, T1-7 và T1-10, nảy mầm và phát triển thành cây chuyển gen T2, T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10. Ở thế hệ T2, sau bảy ngày trong điều kiện stress muối NaCl, kết quả phân tích hàm lượng proline của bốn dòng đậu tương chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7, T2-10 đều cao hơn ở các cây không chuyển gen từ 0,82 $\mu\text{mol/g}$ đến 4,03 $\mu\text{mol/g}$ và cao nhất là dòng T2-7 (7,77 $\mu\text{mol/g}$), trong khi hàm lượng proline của cây không chuyển gen là 3,74 $\mu\text{mol/g}$ ($P < 0,001$) (Bảng 2.4).

Bảng 2.4. Hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T2 và các cây không chuyển gen sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl

Các cây WT và các dòng đậu tương chuyển gen	Hàm lượng proline trong điều kiện bình thường ($\mu\text{mol/g}$) ^A	Sự thay đổi hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gen T2 sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl		
		Hàm lượng proline ($\mu\text{mol/g}$) ^B	Tỷ lệ tăng so với điều kiện bình thường (%)	Tỷ lệ tăng so với các cây không chuyển gen (%)
WT	1.57 ^a \pm 0.027*	3.74 ^a \pm 0.081	238.22	100.00
T2-2	1.84 ^b \pm 0.041	4.56 ^b \pm 0.099	247.83	121.93
T2-4	2.32 ^c \pm 0.034	6.16 ^c \pm 0.044	265.52	164.71
T2-7	2.59 ^c \pm 0.029	7.77 ^d \pm 0.069	300.00	207.75
T2-10	2.34 ^c \pm 0.056	6.29 ^c \pm 0.042	268.80	168.18

Ghi chú: WT: cây không chuyển gen; T2-2, T2-4, T2-7, T2-10: các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T2. A, B: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể bằng phương pháp test Duncan với $P < 0,001$. * Giá trị trung bình \pm sai số chuẩn.

Bảng 2.4 còn cho thấy, so với điều kiện bình thường ở điều kiện stress muối, các cây WT và các dòng chuyển gen có hàm lượng proline tăng từ 238,22% -300%; nếu so với các cây không chuyển gen thì các dòng chuyển gen có hàm lượng proline tăng từ 7,75%-68,18%.

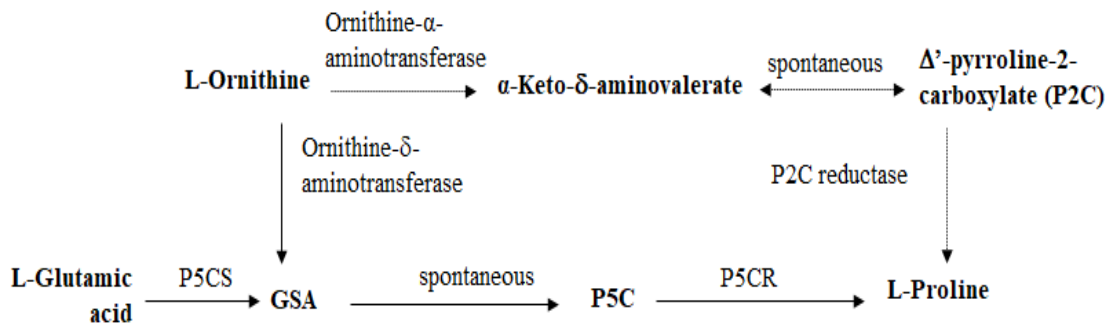
Dựa trên các kết quả phân tích về sự thay đổi hàm lượng proline của dòng đậu tương chuyển gen và cây không chuyển gen sau 7 ngày trong điều kiện stress muối, có thể kết luận rằng các dòng chuyển gen có tính kháng muối cao hơn cây không chuyển gen và dòng T2-7 có khả năng chịu mặn và chịu hạn tốt nhất.

2.2.6. Thảo luận

Các nghiên cứu về tạo cây chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* với các gen liên quan đến khả năng chịu hạn và chịu mặn của cây đậu tương đã được một số nhóm nghiên cứu quan tâm và báo cáo. Chẳng hạn như nghiên cứu về sự biểu hiện của protein liên quan đến sự kéo dài của rễ từ đậu nành [28] và protein liên quan đến tổng hợp các chất làm tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào [53], đánh giá tác động của yếu tố phiên mã NAC mã hóa ở cây *Arabidopsis* [40]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc lựa chọn gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB để tác động nhằm tăng cường phiên mã các gen liên quan đến tính chịu hạn và chịu mặn của cây đậu tương. Gen *GmDREB6*, một thành viên của phân họ DREB đã được tìm thấy trong bộ gen đậu tương [48] và được phân lập từ đậu tương với mã EF551166.1 trên GenBank [26].

Trước đây người ta đã chứng minh rằng DREB là một nhân tố phiên mã có thể liên kết với chuỗi DRE / CRT (lặp lại C) có chứa một mô típ A / GCCGAC để kích hoạt biểu hiện gen trong con đường truyền tín hiệu stress ở thực vật. Vùng mã hóa của gen *GmDREB6* có chiều dài 693 nucleotide, mã hóa 230 axit amin. Miền AP2 của protein DREB6 có 59 axit amin, bao gồm 11 axit amin, vị trí gắn DNA là 60, 61, 63, 65, 67, 69, 73, 75, 82, 84, 8712. Vùng promoter của *GmDREB6* chứa trình tự *cis* –gồm GT-1 và DRE. Cụ thể là: **DRE** (-1113) và **GT-1** (-133, -1398, -1488, -1560, -1993).

Proline là một amino acid tham gia cấu tạo các protein. Proline có vai trò điều chỉnh áp suất thẩm thấu, bảo vệ màng trong điều kiện stress, ức chế các gốc tự do, chống oxy hóa ... [23], [24]. Sự tích lũy hàm lượng proline cao hơn bằng cách tăng cường biểu hiện gen P5CS có thể làm tăng mức độ bảo vệ thực vật, chống lại stress oxy hóa và tăng áp suất thẩm thấu [16]. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật với sự tham gia của hai enzyme chủ chốt là Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) và Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) (Hình 2.21).



Hình 2.21. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật [11]

Ở cây đậu tương, enzyme P5CS được mã hóa bởi gen *GmP5CS* và trình khởi động của gen *GmP5CS* có GT-1, nhưng không có DRE [65]. Vùng promoter của gen *GmDREB6* chứa trình tự *cis* có GT-1 và trình tự khởi động của gen *GmP5CS* cũng có GT-1, do đó, nhân tố phiên mã DREB6 sẽ kích hoạt sự biểu hiện gen *GmP5CS*. Trong các kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy mức độ biểu hiện phiên mã của gen *GmP5CS* trong các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* ở thể hệ T2 cao hơn các cây không chuyển gen trong cả ở điều kiện bình thường và stress muối từ 136,50% đến 200,73% và 158,14% - 315,70%, tương ứng (Hình 2.20).

Các nghiên cứu trước đây cho thấy sự biểu hiện quá mức của P5CS làm tăng tổng hợp proline ở cây chuyển gen [9], [20], [66]. Trong nghiên cứu của

chúng tôi, sự biểu hiện quá mạnh gen *GmDREB6* giúp tăng mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, do đó hàm lượng proline trong các tế bào cao hơn bình thường. Sau bảy ngày trong điều kiện stress muối, hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 đã tăng từ 247,83% lên 300,00% so với điều kiện bình thường; tăng nhiều hơn so với điều kiện bình thường của các cây không chuyển gen từ 9,61% đến 61,78%. Hơn nữa, sau bảy ngày trong điều kiện stress muối, hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 đã tăng so với các cây không chuyển gen từ 1,21 đến 2,07 lần (Bảng 2.2).

Như vậy, gen P5CS có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự tích lũy proline trong điều kiện stress muối và tích cực đóng vai trò bảo vệ thẩm thấu. Do đó, chúng tôi cho rằng, việc biểu hiện quá mức gen *GmDREB6* đã tăng cường khả năng chịu mặn và chịu hạn sinh lý của cây đậu tương chuyển gen bằng cách tăng cường biểu hiện nhân tố phiên mã của gen P5CS và tích lũy các chất thẩm thấu, trong đó proline giữ vai trò quan trọng.

Kết quả đánh giá các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* ở thế hệ T2 đã tạo được 4 dòng chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy amino acid proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen. Các dòng đậu tương chuyển gen T2 được tiếp tục phân tích, đánh giá ở các thế hệ tiếp theo phục vụ tạo giống đậu tương chuyển gen chịu hạn, chịu mặn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

1.1. Trình tự đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* phân lập từ giống đậu tương DT2008 có kích thước 693 bp mã hóa 230 amino acid. Vector chuyển gen *pBII121_GmDREB6* chứa trình tự gen *GmDREB6* nhân tạo được thiết kế thành công và tạo được vi khuẩn *Agrobacterium* tái tổ hợp mang cấu trúc gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB6 của cây đậu tương.

1.2. Bằng kết quả phân tích Southern blot và RT-PCR đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen và hoạt động tốt trong cây thuốc lá.

1.3. Cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* được biến nạp thành công vào cây đậu tương và từ 450 mẫu biến nạp, qua 3 lần chọn lọc bằng kháng sinh kanamicin, kết quả đã tạo được 10 cây đậu tương chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới.

1.4. Gen chuyển *GmDREB6* đã hợp nhất vào hệ gen cây đậu tương T0 được xác nhận bằng kết quả phân tích Southern blot. Đã chứng minh được gen chuyển *GmDREB6* được di truyền từ thế hệ T0 sang thế hệ T1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp DREB6.

1.5. Sự biểu hiện mạnh của gen chuyển *GmDREB6* làm tăng hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* và cải thiện sự tích lũy proline trong cây chuyển gen. Tạo được 4 dòng chuyển gen T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 ở thế hệ T2 có mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy amino acid proline và khả năng chịu mặn, chịu hạn cao hơn các cây đối chứng không chuyển gen.

2. KIẾN NGHỊ

Bốn dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T2 T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10 được tiếp tục phân tích, đánh giá ở các thế hệ tiếp theo phục vụ tạo giống đậu tương chuyển gen chịu hạn, chịu mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010), Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, *Crit Rev Biotechnol*, 30, pp. 161-175.
2. Aragão F. J. L., Sarokin L., Vianna G. R., Rech E. L. (2000), “Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency”, *Theor. Appl. Genet.*, 101, pp. 1– 6.
3. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D (1973), “Rapid determination of free proline for water-stress studies”. *Plant Soil* 39, pp. 205-207.
4. Boyer J.S. (1982), “Plant productivity and environment”, *Science*, 218, pp. 443-448.
5. Beijersbergen A., Dulk R. A. D., Schilperoort R. A., Hooykaas P. J. J. (1992), “Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*”, *Science* 256, pp. 1324 – 1327
6. Bray E.A., (2004), Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp Bot*, 55, pp. 2331-2341.
7. Bubner B., Gase K., Baldwin I. T. (2004), “Two - fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real - time PCR”, *BMC Biotechnology*, 4, pp. 4-14
8. Chen, M. *et al.* (2007), “GmDREB2 a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants”, *Biochem Biophys Res Commun* **353**, pp. 299-305.
9. Chen, J. B., Wang, S. M., Jing, R. L. & Mao, X. G (2009), “Cloning the PvP5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses”, *J Plant Physiol* **166**, pp. 12-19.
10. Cushman J.C, Bohnert H.J. (2000), “Genomic approaches to plant stress tolerance”, *Curr Opin Plant Biol*, 3: pp. 117-124.

11. Delauney, A. J. & Verma, D. P. S (1993), "Proline biosynthesis and osmoregulation in plant". *The Plant Journal* **4**, pp. 215-223.
12. Engels, C. *et al.*(2013), "Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration", *Genet Mol Biol* **36**, pp. 556–565.
13. Furutani N., Hidaka S., Kosaka Y., Shizukawa Y., Kanematsu S., (2006), Coat protein gene - mediated resistance to soybean mosaic virus in transgenic soybean, *Breed. Sci*, **56**, pp.119–124.
14. Gelvin S. B. (2010), "Plant proteins involved in *Agrobacterium* - mediated genetic transformation", *Annu. Rev. Phytopathol.*, **48**, pp. 45–68.
15. Hansen G., Wright M. S. (1999), "Recent advances in the transformation of plants", *Trends Plant Sci.*, **4**, pp. 226–231.
16. Han, K. H. & Hwang, C. H (2003), "Salt tolerance enhanced by transformation of a P5CS gene in carrot", *J Plant Biotech* **5**, pp. 157-161.
17. Hartman G. L., West E. D., Herman, T. K. (2011), "Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests", *Food Sec*, **3**, pp. 5–17.
18. Hinchee M. A. W., Conner W. D. V., Newell C. A., McDonnell R. E., Sato S. J, Gasser C. S., Fischhoff D. A., Re D. B., Fraley R. T., Horsch R. B. (1988), "Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer", *Nat. Biotechnol.*, **6**, pp. 915–922
19. Hussain S.S., Ali M., Ahmad M., Siddique K.H., (2011), "Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants", *Biotechnol Adv*, **29**: pp. 300-311.
20. Hmida-Sayari, A. *et al.*(2005), "Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants", *Plant Sci* **169**, pp.746-752.
21. Jimenez V. M. (2001), "Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones", *Rev, Bras. Fisiol. Veg.*, **13**, pp. 196-223

22. Kita Y., Hanafy M. S., Deguchi M., Hasegawa H., Terakawa T., Kitamura K., Ishimoto M. (2009), "Generation and characterization of herbicide - resistant soybean plants expressing novel phosphino-thricin N-acetyltransferase genes", *Breed. Sci*, 59, pp. 245–251.
23. Kishor, P. K. *et al.* (2005), "Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance". *Curr Sci* 88, pp. 424–438.
24. Kavi Kishor, P. B., Hima Kumari, P., Sunita, M. S. & Sreenivasulu, N (2015), "Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny", *Front Plant Sci* 20, 6:544. doi: 510.3389/fpls.2015.00544.
25. Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227, pp. 680-685.
26. Liu, Y. W. *et al.* (2007), "Glycine max dehydration-responsive element binding protein 6 mRNA, complete cds", *GenBank*, EF551166.551166.
27. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D (2001), "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method", *Methods* 25, pp. 402-408..
28. Lo, T. S. *et al.* (2015), "Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco", *Turk J Bot* 39, pp. 988-995.
29. Mao X., Zhang H., Tian S., Chang X., Jing R. (2009), "TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multi-stress tolerance in *Arabidopsis*", *Journal of Experimental Botany*, 61: pp. 683-696.
30. Marcolino-Gomes J., Rodrigues F.A., Oliveira M.C.N., Farias J.R.B., Neumaier N., *et al.* (2013), "Expression Patterns of *GmAP2/EREB*-Like Transcription Factors Involved in Soybean Responses to Water Deficit", *PLoS ONE*, 8(5): e62294. doi: 10.1371/journal.pone.0062294.
31. Magnani E., Sjölander K., Hake S. (2004), "From endonucleases to

- transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants”, *Plant Cell*, 16: pp. 2265-2277
32. McCabe D. E., Swain W. F., Martinell B. J., Christou P. (1988), “Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration”, *Nat. Biotechnol*, 6, pp. 923–926
 33. Neumaier, N. *et al.* (2013), “Testing dreb genetically modified soybean plants for drought tolerance in both greenhouse and field condition”s. . *In: World soybean research conference, 9/2013, Durban. [Proceedings]*, 216.
 34. Nguyễn Thị Thúy Hương (2011), “Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam”, *Luận án tiến sĩ sinh học*, Đại học Thái Nguyên.
 35. Olhoft P.M., Flagel L.E., Donovan C.M., Somers D.A, (2003), “Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method”, *Planta*, 216, pp. 723–735.
 36. Olhoft, P. M., Bernal, L. M., Grist, L. B. & Ozias-Akins, P (2007), “A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings”, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **43**, pp. 536-549.
 37. Owens L. D., Cress, D. E. (1985), “Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids”, *Plant Physiol*, 77, pp. 87–94.
 38. Parrott W. A., Williams E .G., Hildebrand D. F., Collins G. B. (1989), “Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean”, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 16, pp. 15–21
 39. Padgett S. R., Kolacz K. H., Delannay X., Re D., LaVallee B. J., Tinius C. N., Rhodes K., Otero Y. I., Barry G. F., Eichholtz D. A. (1995), “Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line”, *Crop Sci*, 35, pp.1451–1461.
 40. Quach, T. N. *et al.* (2014), “Functional analysis of water stress-responsive soybean GmNAC003 and GmNAC004 transcription factors in lateral root

- development in arabidopsis". *PLoS One* **9**, e84886.
41. Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W (1984), "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics", *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 8014-8018.
 42. Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2002), "DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: pp. 998-1009.
 43. Shigyo M., Ito M. (2004), "Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes", *Dev. Genes Evol.* 214: pp. 105-114.
 44. Southern, E. M (1975), "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol Biol* **98**, PP. 503-517.
 45. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma, B. & Ezura, H (2006), "Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce", *FEBS Lett* **580**, 620-626.
 46. Stewart C. N. J., Adang M. J., All J. N., Boerma H. R., Cardineau G., Tucker D., Parrott W. A. (1996), "Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene", *Plant Physiol*, 112, pp.121–129
 47. Ratcliffe O.J., Riechmann J.L. (2002), "Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: a genomic perspective", *Curr Issues Mol. Biol.*, 4: pp. 77–91.
 48. Riechmann, J. L. et al. (2000), "Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes", *Science* 290, PP. 2105-2110.
 49. Roberts C. A., Dietzgen R. G., Heelan L. A., Maclean D. J. (2000), "Real - time RT-PCR fluorescnet detection of tomato spotted wilt virus", *J. Virol. Meth.*, 88, pp.1-8.
 50. Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C.Z., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Crelman R., Pilgrim M., Broun

- P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K, Yu G.L. (2000), “*Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes”, *Science*, 290: pp. 2105-2110.
51. Tabashnik B.E. (1994), “Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*”, *Annu. Rev. Entomol*, 39, pp. 47–79.
52. Tang, M., J., S., Liu, Y., Chen, F. & Shen, S (2007), “Isolation and functional characterization of the JcERF gene, a putative AP2/EREBP domain containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*”, *Plant Mol Bio* **163**, 419-428.
53. Tan, D. X., Tuong, H. M., Thuy, V. T. T., Son, L. V. & Mau, C. H (2015), “Cloning and Overexpression of GmDREB2 Gene from a Vietnamese Drought-resistant Soybean Variety”, *Braz Arch Biol Technol* **58**, PP. 651-657.
54. Tomlin E. S., Branch S. R., Chamberlain D., Gabe H., Wright M. S., Stewart, C.N. (2002), “Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons”, *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 38, pp. 543–548.
55. Tougou M., Yamagishi N., Furutani N., Shizukawa Y., Takahata Y., Hidaka S. (2007), “Soybean dwarf virus -resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene”, *Plant Cell Rep*, 26, pp.1967–1975.
56. Trujillo L., Menendez C., Ochogavia M.E., Hernandez I., Borrás O., Rodríguez R., Coll Y., Arrieta J.G., Banguela A., Ramirez R., Hernandez L. (2009), “Engineering drought and salt tolerance in plants using SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor”, *Biotech-nologia Aplicada*, 26: pp. 168-171.
57. Valente M. A. S., Faria J. A. Q. A., Soares-Ramos J. R. L., Reis P. A. B., Pinheiro G. L., Piovesan N. D., Morais A. T., Menezes C. C., Cano M. A. O., Fietto L. G. (2009), “The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco”, *J. Exp. Bot*, 60, pp. 533–546.
58. Vassusjfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. (2003), “The cold-

- regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A”, *Mol. Genet. Genomics*, 269: p. 60-67.
59. Walker D., Boerma H. R., All, J. Parrott W. (2002), “Combining cry1Ac with QTL alleles from PI 229358 to improve soybean resistance to lepidopteran pests”, *Mol. Breed*, 9, pp. 43–51.
60. Wang S., Yang S., Yin Y., Guo X., Wang S., *et al.* (2009), “An *in silico* strategy identified the target gene candidates regulated by dehydration responsive element binding proteins (DREBs) in *Arabidopsis* genome”, *Plant molecular biology*, 69: pp. 167-178. doi: 10.1007/s11103-008-9414-5.
61. Wang, N. *et al.* (2017), “Drought Tolerance Conferred in Soybean (*Glycine max.* L) by GmMYB84, a Novel R2R3-MYB Transcription Factor”. *Plant Cell Physiol* **58**, PP. 1764-1776, doi:10.1093/pcp/pcx111..
62. Weigel D. (1995), “The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain”, *Plant Cell*, 7: pp. 388-389.
63. Yamada T., Takagi K., Ishimoto, M. (2012), “Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis”, *Breeding Science*, 61, pp. 480–4937
64. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006), “Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses”, *Annu. Rev. Plant Biol*, 57: pp. 781-803.
65. Zhang, X. X. *et al.* (2013), “OsDREB2A, a Rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean”, *PLoS ONE* **8**, e83011. doi:83010.81371/journal.pone.0083011.
66. Zhang, G. C., Zhu, W. L., Gai, J. Y., Zhu, Y. L. & Yang, L. F (2015), “Enhanced salt tolerance of transgenic vegetable soybeans resulting from overexpression of a novel Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from *Solanum torvum* Swartz”, *Hort Envir Bio* **56**, pp. 94-104.
67. Zeng P., Vadnais D. A., Zhang Z., Polacco J.C. (2004), “Refined glu-fosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]”, *Plant Cell Rep.*, 22, pp. 478–482.

68. Zhu J.K. (2001), “Plant salt tolerance”, *Trends Plant Sci*, 6: pp. 66-71.
69. Zhu S., Walker D. R., Boerma H. R., All J., Parrott W. A. (2008), “Effects of defoliating insect resistance QTLs and a cry1Ac transgene in soybean near-isogenic lines”, *Theor. Appl. Genet*, 116, pp. 455–463.
70. Zhu Q., Zhang J., Gao X., Tong J., Xiao L., Li W., Zhang H. (2010), “The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses”, *Gene*, 457: pp. 1-12.
71. Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn (2010), “Nghiên cứu khả năng tái sinh và biến nạp gen qua nách lá mầm của 2 giống đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) DT12 và DT84 bằng *Agrobacterium*”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B), pp.1305-1310.
72. Trần Thị Cúc Hòa (2007), “Nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam “*Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* 18, pp. 11-16.
73. Nguyễn Thị Thúy Hương, Trần Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2009) Phát triển hệ thống tái sinh *in vitro* ở cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) phục vụ chuyển gen, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 52(4): 82-88.
74. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thúy Hương, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Hà (2011), *Gen và đặc tính chịu hạn của cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)*. Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
75. Lò Thị Mai Thu (2014), *Phân lập đoạn gen CP từ Soybean mosaic virus và phát triển vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi phục vụ tạo cây đậu tương chuyển gen kháng bệnh*. Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên.
76. Lò Thanh Sơn (2015) *Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen GmEXP1 liên quan đến sự phát triển bộ rễ của cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)*”. Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên.
77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/nucleotide>

**THUYẾT MINH ĐỀ TÀI, HỢP ĐỒNG VÀ VĂN BẢN ĐIỀU
CHỈNH ĐÃ ĐƯỢC PHÊ DUYỆT**