

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

**BÁO CÁO TÓM TẮT
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 TÓM TẮT
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	iii
Danh mục hình	iii
Danh mục ký hiệu, từ và chữ viết tắt	iv
Thông tin kết quả nghiên cứu	v
Information on research results	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu	1
2. Những đóng góp khoa học của đề tài	1
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	2
Chương 1. MỤC TIÊU, NỘI DUNG, ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI, CÁCH TIẾP CẬN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	3
1.1. Mục tiêu nghiên cứu và nội dung nghiên cứu	3
1.1.1. Mục tiêu nghiên cứu	3
1.1.2. Nội dung nghiên cứu	3
1.2. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu	3
1.2.1. Đối tượng nghiên cứu	3
1.2.2. Vật liệu thực vật	3
1.2.3. Các chủng vi khuẩn và các loại vector	4
1.2.4. Thiết kế, tổng hợp gen <i>GmDREB6</i> và các cặp môi PCR	4
1.3. Phạm vi và địa điểm nghiên cứu	4
1.3.1. Phạm vi nghiên cứu	4
1.3.2. Địa điểm nghiên cứu	4
1.4. Cách tiếp cận và phương pháp nghiên cứu	4
1.4.1. Cách tiếp cận nghiên cứu	4
1.4.2. Phương pháp nghiên cứu	5
Chương 2. NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	6
2.1. Tổng quan tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài	6
2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận	6
2.2.1. Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa nhân tố phiên mã <i>GmDREB6</i>	6
2.2.2. Phân tích hoạt động của vector chuyển gen <i>pBII21_GmDREB6</i> trên cây thuốc lá	9
2.2.3. Kết quả chuyển gen <i>GmDREB6</i> vào đậu tương và tạo cây chuyển gen	10
2.2.4. Phân tích biểu hiện của gen chuyển ở các dòng đậu tương chuyển gen	10
2.2.5. Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển <i>GmDREB6</i>	11
2.2.6. Thảo luận	13
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	15

DANH MỤC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.....	4
Bảng 2.1. 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....	13

DANH MỤC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.....	5
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>	6
Hình 2.3. Kết quả phân tích BLAST gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008	7
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>	7
Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen <i>pBII21_GmDREB6</i>	8
Hình 2.10. A- Gel điện di của sản phẩm cắt từ vector <i>pPU18_GmDREB6</i> và <i>pBII21_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>pBII21_GmDREB6</i>	8
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.....	8
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.....	9
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.....	9
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.....	9
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.....	10
Hình 2.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh <i>in vitro</i> và tạo cây đậu tương chuyển gen	10
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.....	11
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.....	11
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.....	11
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.....	12
Hình 2.21. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật.....	14

DANH MỤC KÝ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABA	Abscisic 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-galactopyranoside	
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

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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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* (cDNA) phân lập từ giống đậu tương DT2008 có kích thước 693 bp mã hóa 230 amino acid. Vector chuyển gen *pBI121_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 thể 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

Các bài báo công bố:

1. Thi Ngoc Lan Nguyen, Phutthakone Vaciaxa, 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 DT12”, *Tạp chí Khoa học-Công nghệ, Đại học Thái Nguyên* 180(04), tr. 81 – 86.
4. Đỗ Thanh Kim Hương, 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 DT12*. 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 Vaciaxa “*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 Vaciaxa 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: *pBI121_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 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 (cDNA) isolated from DT2008 soybean cultivar is 693 bp in size, encoded 230 amino acids. The *pBII21_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 Vaciaxa, 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 trồng 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

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 *pBII21_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 môi 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 nách 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 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.

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	693 BP
	TTAATATGATTCCCATAGA	
<i>XbaI-DREB6-F/ DREB6-</i> <i>SacI-R:</i>	ATGAAGTTCAACCAACCACTTCAT	741 bp
	ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGT	
<i>nptII-F /nptII-R</i>	GAGGCTATTCGGCTATGACTG	963 bp
	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	
<i>qGmP5CS-F/ qGmP5CS-</i> <i>R</i>	CGAACTGAGCTTGCAGAGGGGC	165 bp
	TCGCTTAGCCTCCTTGCCTCC	
<i>qAct-F /qAct-R</i>	GATCTTGCTGGTCGTGATCTT	152 bp
	GTCTCCAACCTTTGCTCATAGTC	
<i>pUC18-F/pUC18-R</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	840 bp
	CAGTATCGACAAAGGAC	

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

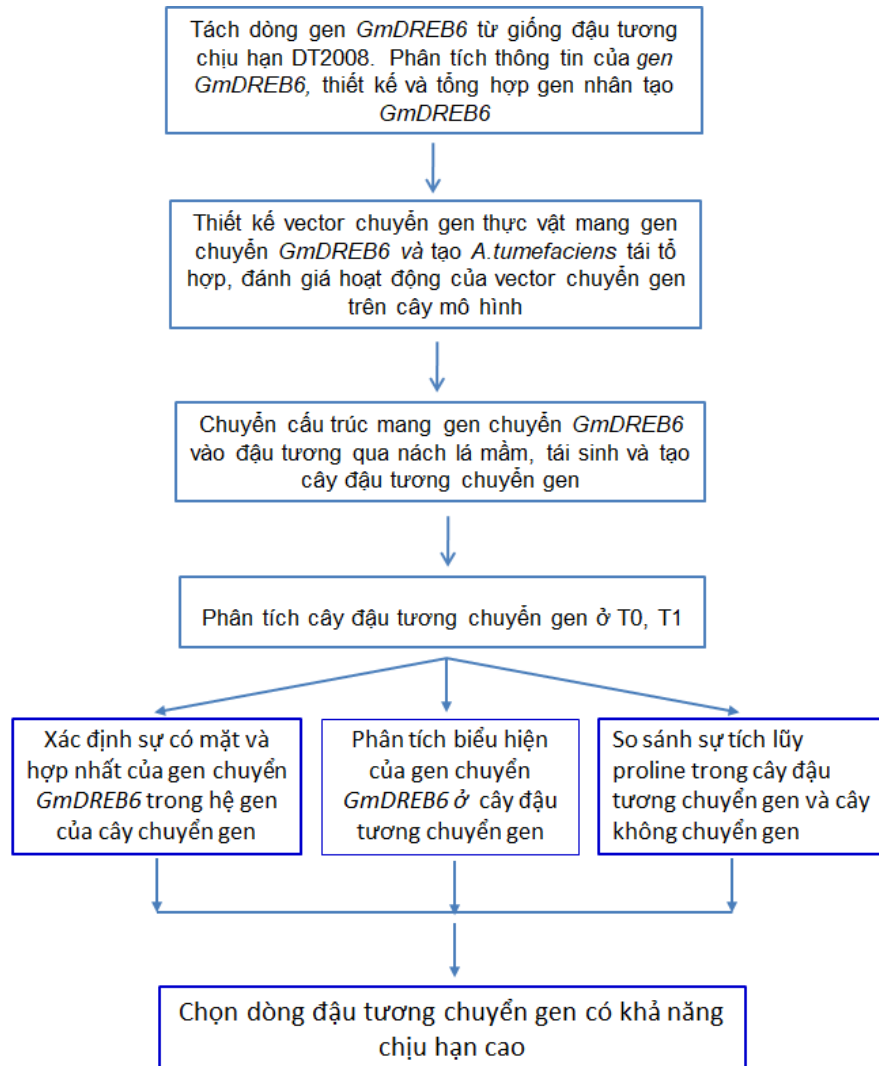
Tạo dòng cây đậu tương có khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học được tiến hành theo cách tiếp cận ứng dụng kỹ thuật chuyển gen, cụ thể là: (i) Nhân bản, tách dòng và xác định trình tự gen mã

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

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

Các nhóm phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu được sử dụng bao gồm:

- Phương pháp phân lập gen *GmDREB6* từ cây đậu tương
- Thiết kế vector chuyển gen thực vật và tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp
- Kỹ thuật chuyển gen vào thuốc lá và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen
- Kỹ thuật chuyển gen vào nách lá mầm đậu tương giống DT84
- Phân tích, đánh giá cây chuyển gen bao gồm các phương pháp như kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen bằng PCR; phương pháp Southern blot; Phân tích cây chuyển gen bằng lai Western; phân tích cây chuyển gen bằng Real time RT-PCR; xử lý stress muối và phân tích hàm lượng proline trong cây chuyển gen

Chương 2. NỘI DUNG VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

2.1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

Đề tài tổng kết 77 tài liệu để phân tích một số nội dung cơ bản liên quan, đó là: (1) Cơ chế chịu hạn của thực vật; (2) Họ nhân tố phiên mã AP2 và phân họ DREB; (3) Ứng dụng tiến bộ kỹ thuật trong chuyển gen ở cây đậu tương; (4) **Nghiên cứu biểu hiện nhân tố phiên mã *GmDREB6***; (5) Tình hình nghiên cứu tạo cây đậu tương biến đổi gen ở Việt Nam.

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:

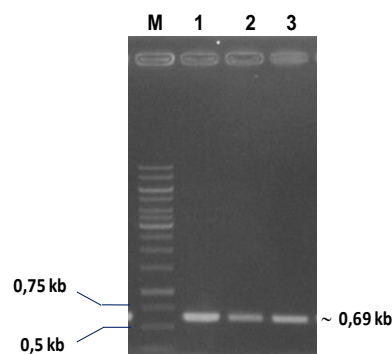
DREB6-F: 5' – ATGGTCATGGAAGAATCTAAC - 3'

DREB6-R: 5' - TTAATATGATTCCCATAGA -3'

Đoạn DNA được nhân bản dự kiến có kích thước là 693 bp.

Kết quả 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* trên hình 2.1 cho thấy một băng đặc hiệu với kích thước khoảng 0,69 kb, đúng như tính toán theo lý thuyết.



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 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 để nhân dòng. 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 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

	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

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.

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 cmc, tổng cộng là 741 nucleotide. Gen *GmDREB6* được chèn vào vector pUC18 (*pUC18_GmDREB6*).

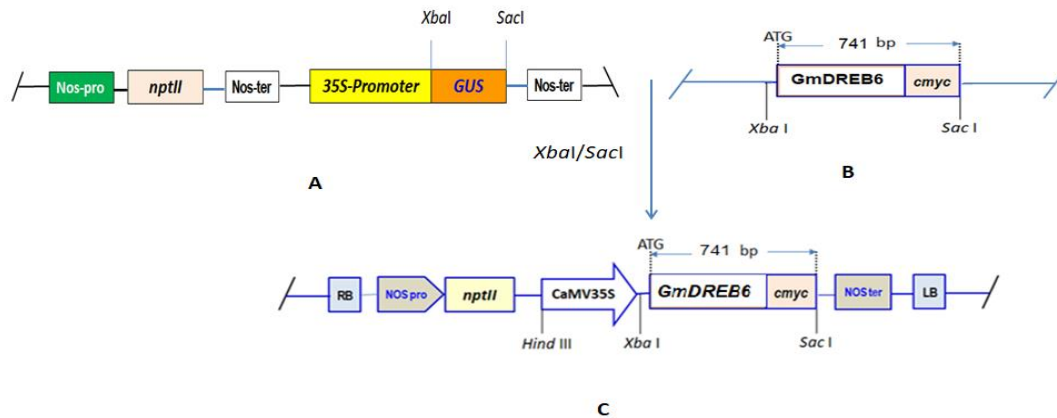
5' [gctctaga](#)ATGGTCATGGAAGAATCTAACCATTAGACAATGAAGTTCAACCAACCACTTCATCATCTCTTTTAC
CATTACTACTCCCTCTACCTCCTCTTCTTCCCTCCATAGAAGAAGCCACTAACACTACAAAGGAGAAAAAGAAGAAA
GCCAATAGTAATGAAGGCAAGCACCCCTACGTATAGAGGAGTTCGCATGCGTCAATGGGGCAAATGGGTATCCGAAA
TTAGAGAGCCAAGGAAGAAATCAAGAATTTGGCTTGGTACTTTTTCCACGCCCGATATGGCGGCTCGAGCCCATGA
CGTGGCGGCTCTCACGATCAAAGGCAGCTCGGCTTACCTCAATTTCCAGAATTAGCCGACGAGCTGCCCCGCCCC
GCCAGCACCTCCCCAAGGACATCCAAGCTGCGGCGTCTAAAGCCGCTGCCTTGGATTTTCGGCCACCGAAGCCATG
ACGCCGAGTCCGAGCTGAGCCGAGCCGTTTCTCTCAATCTCACACAAGCATCATCATCATCAATTCATC
ATCGTTGAAGGGTGTGGATGACACATTCTTGGACCTTCTGATCTCTCTCTCGACTTGAGCCATGGAGCCGATGAG
TTTCATTATTTCGTCAGCTTGGCTTGTAGCCGAGCCGAACATATAGAGCTGGGTTTTTCGGCTTGAGGATCCTTTTC
TATGGGAATCATATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAAGagctcg 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).

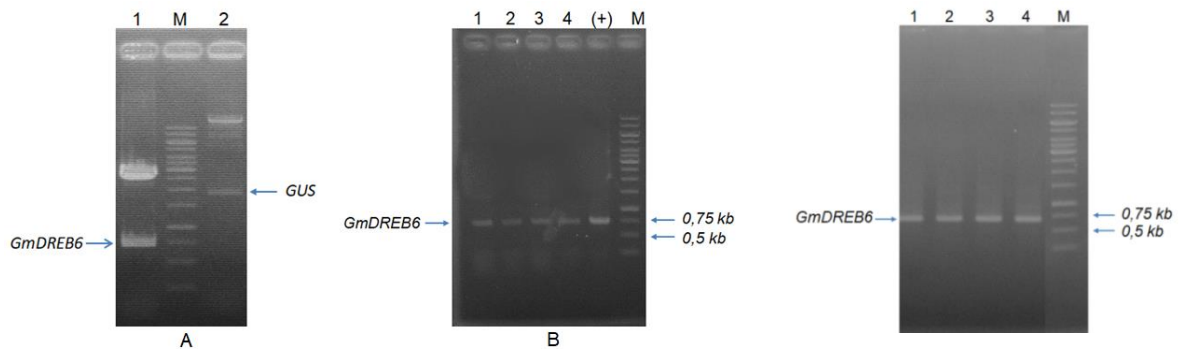


Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*. A: vector *pBI121_GUS*; B: vector *pUC18_GmDREB6*; C: *pBI121_GmDREB6*; nptII: neomycin-phospho-transferase II; 35S: virus khảm súp lơ 35S Promer; *GmDREB6-cmyc*: gen *GmDREB6* chứa *cmyc* và vị trí cắt của cặp enzyme *XbaI / SacI*.

Kết quả cắt *pUC18-GmDREB6* để thu được gen *GmDREB6* và loại bỏ gen *GUS* khỏi vector *pBI121_GUS* được thể hiện hình 2.10A. Vector 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.



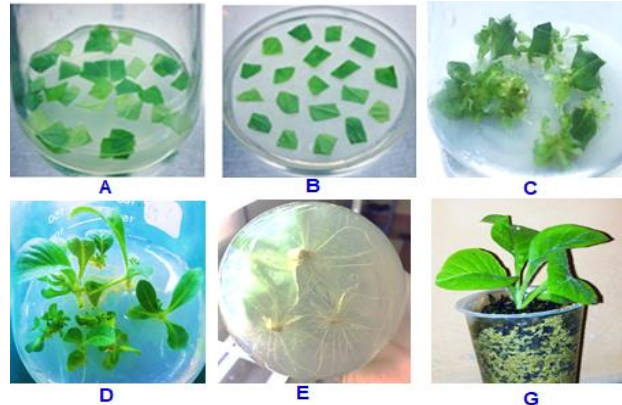
Hình 2.10. A- Gel điện di của sản phẩm cắt từ vector *pPU18_GmDREB6* và *pBI121_GUS* với cặp enzyme *SacI / XbaI*. 1: *pPU18_GmDREB6*; M: thang DNA 1 kb; 2: *pBI121_GUS*. B- Gel điện di của sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc *E.coli* DH5 α để kiểm tra gen *GmDREB6* trong cấu trúc *pBI121_GmDREB6*. M: thang 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.

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).

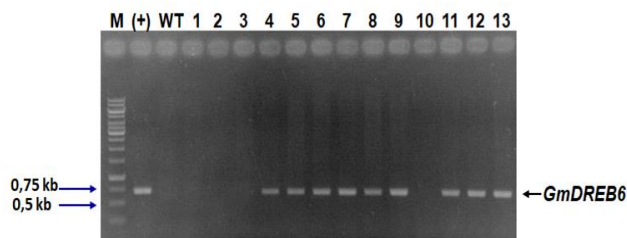


Hình 2.12. Hình ảnh mô tả tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua lây nhiễm *A.tumefaciens* tái tổ hợp vào các mảnh lá thuốc lá. A: Các mảnh lá ngâm trong dịch huyền phù *A.tumefaciens*; B: Các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy; C, D: Tái sinh đa chồi và kéo dài chồi; E: Các chồi trên môi trường ra rễ; (F): Cây thuốc lá chuyển gen được trồng trên giá thể.

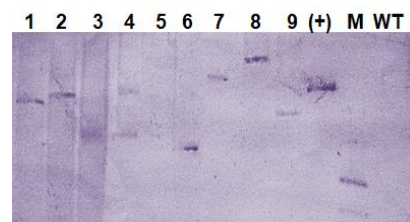
Từ 180 mẫu trong ba lần biến nạp có 539 chồi được tạo ra trong môi trường tái sinh đa chồi và môi trường kéo dài chồi, có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin, trong đó có 309 chồi sinh trưởng tốt chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả có 101 cây con đã được trồng trên chậu, trong đó 48 cây được chuyển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

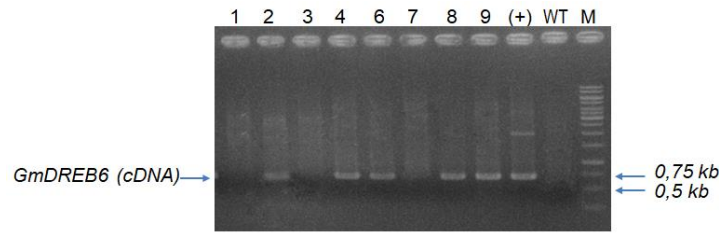


Hình 2.13. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển *GmDREB6* từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0. M: thang DNA 1 kb; (+): plasmid *pBI121-GmDREB6*; WT: cây không chuyển gen; 1-13: Các cây chuyển gen thế hệ T0 (T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13).



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)

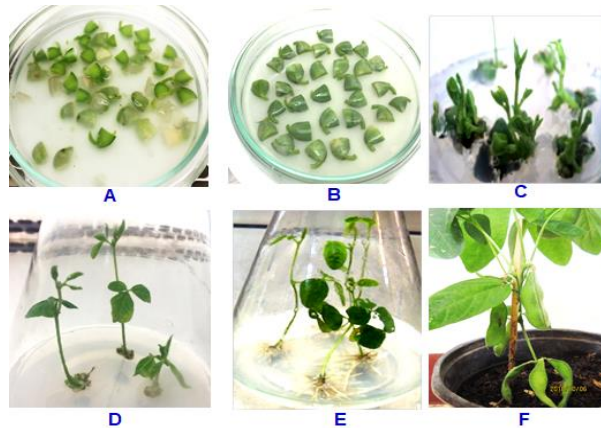
Kết quả phân tích sự biểu hiện ở mức phiên mã của tám cây T0 dương tính với Southern blot bằng phản ứng RT-PCR cho thấy có 5 cây T0 được phiên mã để tạo ra mRNA, đó là: T0-5, T0-7, T0-9, T0-12, T0-13 (Hình 2.15). Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* đã được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen.



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 *pBI121-GmDREB6*; WT: cây không chuyển gen; 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9: Các cây thuốc 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

Vectơ *pBI121_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.



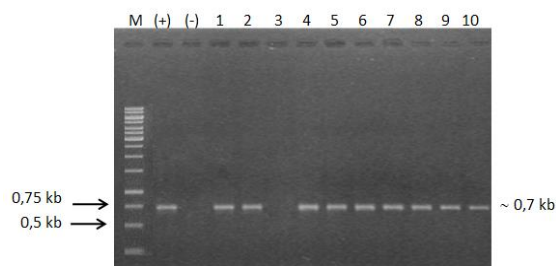
Hình 2.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh *in vitro* và tạo cây đậu tương chuyển gen.

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 trâu hun:1 cát trong điều kiện nhà lưới.

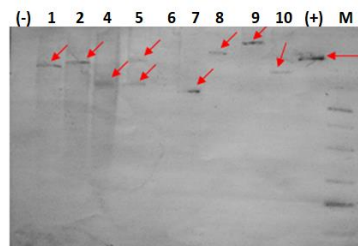
2.2.4. Phân tích biểu hiện của gen chuyển ở các dòng đậu tương chuyển gen

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.

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.

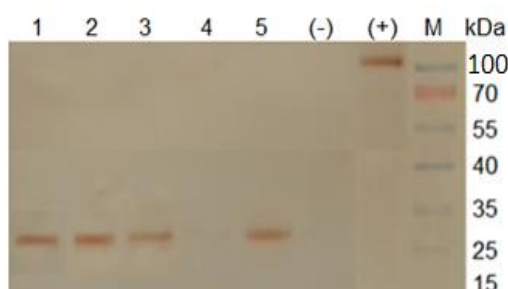


Hình 2.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác nhận sự có mặt của gen chuyển GmDREB6 trong các cây đậu tương chuyển gen T0. M: thang DNA 1,0 kb; (+): Vector *pBI121_GmDREB6*; (-): Đậu tương không chuyển gen; 1-10: Cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 được ký hiệu là T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-10.



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.

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. 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.

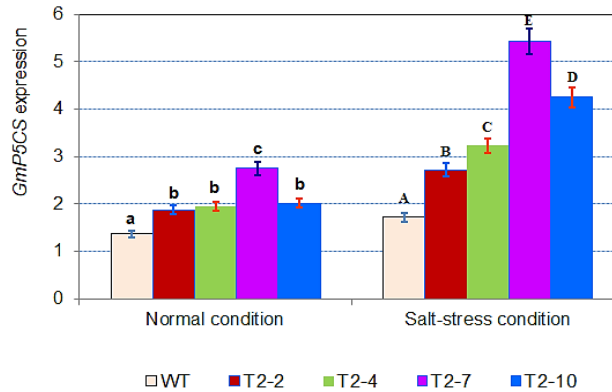
Hạt của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T1 nảy mầm và phát triển thành cây T2, gồm các dòng T2-2, T2-4, T2-7, T2-10 trên giá thể là cát sạch. Phân tích sự biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6* thông qua so sánh sự biểu hiện của gen *GmP5CS* và khả năng tích lũy proline giữa các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

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.



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.

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 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.

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.

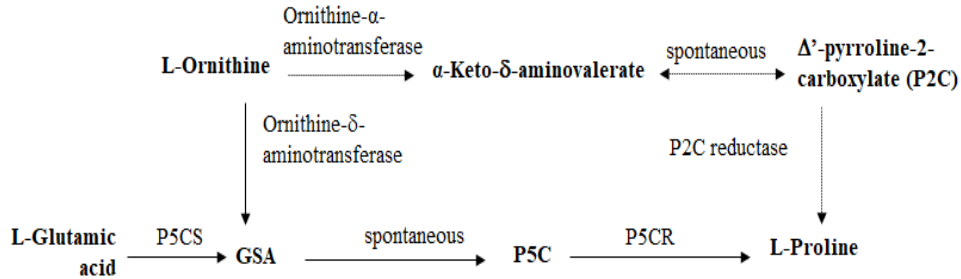
2.2.6. Thảo luận

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 và protein liên quan đến tổng hợp các chất làm tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào, đánh giá tác động của yếu tố phiên mã NAC mã hóa ở cây *Arabidopsis*. 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 và được phân lập từ đậu tương với mã EF551166.1 trên GenBank.

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 ... 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. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật với sự tham gia của hai enzyme chủ chốt là Δ '-pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) và Δ '-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) (Hình 2.21).

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. 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 thế 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).



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

Các nghiên cứu trước đây cho thấy sự biểu hiện quá mức của P5CS làm tăng tổng hợp proline ở cây chuyển gen. 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 *pBI121_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.