

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

Phutthakone VACIAXA

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *GmDREB6* NHẪM NÂNG
CAO KHẢ NĂNG CHỊU MẶN Ở CÂY CHUYỂN GEN**

**Ngành: Di truyền học
Mã số: 9420121**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2021

Công trình được hoàn thành tại :
Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Người hướng dẫn khoa học: 1. GS.TS. Chu Hoàng Mậu
2. TS. Phạm Thị Thanh Nhân

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường họp
tại Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên
Vào hồi giờ phút, ngày tháng năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên
3. Thư viện Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tan Quang Tu, Phutthakone Vaciata, Thu Thi Mai Lo, Nhung Hong Nguyen, Nhan Thi Thanh Pham, Quan Huu Nguyen, Phat Tien Do, Lan Thi Ngoc Nguyen, Yen Thi Hai Nguyen, Mau Hoang Chu (2021), “GmDREB6, a soybean transcription factor, notably affects the transcription of the *NtP5CS* and *NtCLC* genes in transgenic tobacco under saltstress conditions”, *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(12), pp.7175-7181. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.018>. (SCIE, Q1, IF: 4,219)
2. Phutthakone Vaciata, Trần Thị Hồng, Phạm Thị Thanh Nhân, Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu (2021), “Nghiên cứu biến nạp gen *GmDREB6* thông qua *Agrobacterium tumefaciens* ở giống đậu tương ĐT22”, *TNU Journal of Science and Technology* 226(01), pp. 57 – 64.
3. Nguyễn Thị Ngọc Lan, Phutthakone Vaciata, Nguyễn Thành Chung, Nguyễn Hữu Quân, Phạm Thị Thanh Nhân, Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu (2021), “Đặc điểm và sự phát sinh của phân họ gen *DREB* ở đậu tương [*Glycine max* (L.) Meril]”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam* 63 (2), pp.60-64.
4. Thi Ngoc Lan Nguyen, Phutthakone Vaciata, 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”, *European Journal of Engineering Research and Science* 4 (6), pp. 135-139.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill (2n=40)] thuộc họ Đậu (Fabaceae) là loại cây trồng có vị trí quan trọng trong cơ cấu cây nông nghiệp và trong đời sống của con người của nhiều quốc gia trên thế giới và ở Việt Nam. Đậu tương không chỉ có giá trị kinh tế và dinh dưỡng, mà còn giữ vai trò quan trọng trong việc cải thiện độ phì nhiêu của đất và sử dụng bền vững tài nguyên đất canh tác.

Đậu tương được xem là cây trồng nhạy cảm với các yếu tố bất lợi phi sinh học và thuộc nhóm cây chịu hạn, mặn kém. Hạn và mặn là các yếu tố phi sinh học nghiêm trọng nhất và có thể làm giảm năng suất đậu tương khoảng 40%, thậm chí đến 90%, đồng thời làm giảm chất lượng hạt. Hiện nay, do biến đổi khí hậu toàn cầu, đặc biệt là hạn kéo dài, nước biển dâng xâm lấn đất trồng trọt, gây thiệt hại lớn cho sản xuất nông nghiệp ở nhiều quốc gia, trong đó có Việt Nam. Do đó, giải pháp chọn tạo giống đậu tương có khả năng chịu hạn, chịu mặn ứng phó với biến đổi khí hậu là vấn đề cấp thiết, có tính thời sự ở Việt Nam và thế giới.

Đặc tính chống chịu hạn, chịu mặn của cây đậu tương do nhiều gen quy định. Sản phẩm của mỗi gen có thể liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện khả năng chống chịu hạn, mặn như gen liên quan đến tổng hợp proline, sự kéo dài rễ hoặc các gen điều hòa nhóm gen chống chịu. Nghiên cứu sự biểu hiện các gen điều hòa sự phiên mã của nhóm gen chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học là cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong chiến lược phát triển giống đậu tương có khả năng chống chịu tốt các nhân tố phi sinh học, như hạn, mặn, khô, nhiệt... Một số gen mã hóa nhân tố phiên mã ở đậu tương đã được mô tả là có phản ứng với hạn, mặn ở mức phiên mã, trong đó có protein DREB (Dehydration responsive element binding protein). DREB là một phân họ thuộc nhân tố phiên mã AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive), có kiểu tác động *trans* và có thể liên kết với trình tự *cis* để kích hoạt biểu hiện gen mục tiêu khi có tín hiệu stress phi sinh học. Phân

họ DREB ở cây đậu tương gồm các thành viên được xác định có trong hệ gen và một số sản phẩm dịch mã của các gen *GmDREB* đã được khẳng định có chức năng chịu hạn và chịu mặn. Tuy nhiên, một vài thành viên trong phân họ gen *DREB* chưa được nghiên cứu đầy đủ và làm rõ vai trò của chúng đối với tính chịu hạn, chịu mặn của cây đậu tương, trong đó có gen *GmDREB6*.

Hướng tiếp cận ứng dụng kỹ thuật chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB và làm rõ chức năng của một số gen *GmDREB* trong hệ gen cây đậu tương nhằm cải thiện đặc tính di truyền, tạo các dòng chuyển gen thích nghi với điều kiện hạn, mặn được đặc biệt quan tâm. Vì vậy, gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB6 liên quan đến tính chống chịu các stress phi sinh học nói chung và tính chịu hạn, mặn nói riêng được lựa chọn làm gen chuyển trong mục đích cải thiện khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây đậu tương. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi đã chọn và tiến hành đề tài luận án: **“Nghiên cứu biểu hiện gen *GmDREB6* nhằm nâng cao khả năng chịu mặn ở cây chuyển gen”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- 2.1. Phân tích được đặc điểm của phân họ gen *DREB* trong hệ gen của cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill).
- 2.2. Biểu hiện được protein tái tổ hợp GmDREB6 và đánh giá được chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB6* trên cây thuốc lá chuyển gen.
- 2.3. Biến nạp được cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* vào đậu tương và tạo được cây đậu tương chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

- 3.1. Nghiên cứu đặc điểm của phân họ gen *DREB* ở cây đậu tương bằng Tin sinh học
 - 1) Sử dụng Tin sinh học để tìm kiếm các trình tự gen *DREB* của cây đậu tương trên ngân hàng dữ liệu NCBI.
 - 2) Xác định số lượng gen *DREB*, vị trí, số bản copy của mỗi gen *DREB* trong hệ gen cây đậu tương.

3) Xây dựng cây phát sinh chủng loại của phân họ DREB ở đậu tương.

3.2. Nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen thực vật chứa gen *GmDREB6* và phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá.

1) Nghiên cứu thông tin về gen *DREB6* của đậu tương từ ngân hàng dữ liệu NCBI, thiết kế và tổng hợp nhân tạo *GmDREB6*.

2) Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen *GmDREB6*.

3) Phân tích biểu hiện của gen *GmDREB6* từ đậu tương trên cây thuốc lá ở mức phiên mã

3.3. Nghiên cứu mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6*, *NtP5CS*, *NtCLC* trên cây thuốc lá chuyển gen bằng Real time qRT-PCR

1) Phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* từ đậu tương trên cây thuốc lá chuyển gen.

2) Phân tích mức độ biểu hiện của gen *NtP5CS* và *NtCLC* trên cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB6*.

3.4. Nghiên cứu biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* vào cây đậu tương

1) Lây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp vào lá mầm đậu tương. Tái sinh đa chồi, ra rễ và tạo cây đậu tương chuyển gen.

2) Xác định sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trên các cây đậu tương chuyển gen T₀.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình nghiên cứu đặc điểm của phân họ gen *DREB* trong hệ gen cây đậu tương và phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá chuyển gen. Những đóng góp mới của luận án được thể hiện cụ thể là:

1) Đã xác định được 18 gen *GmDREB* thuộc phân họ DREB của cây đậu tương (*Glycine max*) nằm trên 17 nhiễm sắc thể. Gen *GmDREB3* có 8 bản copy, các gen còn lại có từ 1-4 bản copy. Miền AP2 phổ biến có 59-60 amino acid và motif PTPEMAARAYDVAALALKGPSARLNFPEL có ở tất cả các protein DREB của đậu tương. AP2 chứa 11 điểm liên kết với promoter của các gen chức năng phổ biến là RGRRWKERRWT. Cây phát

sinh chủng loại của các gen *GmDREB* và miền AP2 đã thể hiện sự tiến hóa của họ gen này.

2) Sự biểu hiện của gen *GmDREB6* từ đậu tương làm tăng mức độ phiên mã của các gen *NtP5CS* và *NtCLC* của cây thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn đã được chứng minh bằng thực nghiệm. Trong điều kiện stress mặn, các dòng thuốc lá chuyển gen có mức phiên mã của gen *GmDREB6* tăng từ 2,40 đến 3,22 (lần) so với điều kiện không xử lý mặn; mức độ phiên mã của gen *NtP5CS* tăng từ 1,24 đến 3,60 (lần), của gen *NtCLC* tăng 3,65 - 4,54 (lần) so với cây WT ($P < 0,05$).

3) Đã biến nạp thành công cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* vào giống đậu tương ĐT22 thông *A. tumefaciens* tạo được 8 cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6* dương tính với PCR và 5 cây cho kết quả phân tích RT-PCR.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Kết quả nghiên cứu phân họ gen *DREB* ở đậu tương đã làm rõ đặc điểm cũng như sự phát sinh của phân họ gen *DREB* ở cây đậu tương tạo cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu chức năng của các gen *DREB* trong hệ gen của cây đậu tương.

Kết quả phân tích sự biểu hiện mạnh của gen *GmDREB6* làm tăng mức độ phiên mã của gen *NtP5CS* và *NtCLC* của cây thuốc lá chuyển gen đã chứng minh vai trò của nhân tố phiên mã *DREB6* đối với khả năng chịu mặn của cây đậu tương trong điều kiện stress mặn.

Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* có thể sử dụng chuyển vào cây đậu tương hoặc các loại cây trồng khác trong mục đích tăng cường khả năng chịu mặn của cây chuyển gen. Đồng thời, những kết quả bước đầu tạo cây chuyển gen *GmDREB6* đã mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen tạo ra giống đậu tương chịu mặn góp phần ứng phó với biến đổi khí hậu và hạn mặn thường xuyên xảy ra hiện nay ở Việt Nam.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 128 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (5 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (40 trang); Chương

2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (14 trang); Chương 3: Kết quả và thảo luận (31 trang); Kết luận và đề nghị (2 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (28 trang); Phụ lục (3 trang). Luận án có 12 bảng, 26 hình, 1 phụ lục và 156 tài liệu tham khảo và 8 trang web.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 156 tài liệu về ba vấn đề cơ bản, đó là: (1) Đặc tính chịu hạn, mặn của thực vật và cây đậu tương; (2) Nhân tố phiên mã DREB ở thực vật và cây đậu tương; (3) Kỹ thuật chuyển gen trong nghiên cứu cải thiện đặc tính chống chịu của cây đậu tương

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill ($2n=40$)] là loại cây trồng vừa có giá trị kinh tế, dinh dưỡng và vừa là cây cải tạo đất nông nghiệp. Đậu tương thuộc nhóm cây chống chịu kém các yếu tố bất lợi phi sinh học, như hạn và mặn. Stress phi sinh học là nguyên nhân chính dẫn đến mất mùa trên toàn thế giới, gây ra thiệt hại đến năng suất ở nhiều loại cây trồng. Trong số các stress phi sinh học, hạn và mặn là các yếu tố chính làm giảm năng suất cây trồng. Stress hạn, mặn phá vỡ sự cân bằng nội môi và phân bố ion trong tế bào. Cây trồng phản ứng với các stress hạn, mặn 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. Cơ chế chịu mặn của thực vật đã được xác định, đó là sự tích lũy và duy trì nồng độ cao các chất hòa tan trong tế bào nhằm đảm bảo sức cạnh tranh nước với môi trường nhiễm mặn và chống lại hiện tượng hạn sinh lý. Thực vật có khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu ngay cả khi tiếp xúc với môi trường nhiễm mặn. Tuy nhiên, khi bị nhiễm mặn thực vật thường hạn chế khả năng thẩm thấu nước của màng tế bào.

Các cơ chế sinh lý và sinh hóa khác nhau trong tế bào đã giúp thực vật tồn tại, sinh trưởng và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao, bao gồm (1) cân bằng nội môi và ngăn ngừa ion, (2) vận chuyển và hấp thu ion (3) sinh tổng hợp các chất bảo vệ thẩm thấu và các chất hòa tan tương

thích, (4) kích hoạt enzym chống oxy hóa và tổng hợp các hợp chất chống oxy hóa, (5) tổng hợp polyamine, (6) tạo oxit nitric (NO), và (7) điều chế hormon. Protein vận chuyển clorua (Chloride channel-CLC) là chất vận chuyển anion quan trọng tồn tại ở vi khuẩn, nấm men, thực vật và động vật. Các ion Cl^- rất quan trọng đối với một số quá trình sinh học trong tế bào, như khử cực màng, điều chỉnh thể tích tế bào, khả năng chống lại stress mặn, khả năng chịu đựng với kim loại. Có thể suy đoán rằng protein CLC có thể tham gia vào quá trình sự di chuyển của Cl^- qua các bào quan trong tế bào. Sự biểu hiện của protein CLC đã làm tăng vận chuyển Cl^- từ tế bào chất vào không bào và tạo khả năng chống chịu NaCl cho tế bào.

Đường hòa tan, proline, glycine betaine, axit hữu cơ và đường trehalose là một số chất thẩm thấu chính. Nhiều nghiên cứu đã nhận thấy rằng hàm lượng proline đã tăng trong các dòng tế bào chịu NaCl. Sự tích lũy proline đã tăng lên khi thực vật sống trong điều kiện stress mặn. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật có sự tham gia của hai enzyme chính: Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) và Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS). Sự tích tụ proline là một trong những nguyên nhân chính làm tăng áp suất thẩm thấu, do đó làm tăng khả năng giữ nước của cây.

Các công trình nghiên cứu về DREB đều khẳng định protein DREB là nhân tố phiên mã tham gia tích cực vào quá trình chống chịu với các yếu tố bất lợi phi sinh học bằng cách kích hoạt hoạt động của các gen tham gia trực tiếp chống lại các nhân tố như hạn, mặn. 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 các stress phi sinh học. Trong số các gen *GmDREB* trong hệ gen của cây đậu tương, một số gen đã được làm rõ chức năng, như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5*. Trong đó, *GmDREB1* có chức năng chịu nóng, hạn và lạnh. *GmDREB2* được xác nhận làm tăng khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây chuyển gen. *GmDREB3* làm tăng cường khả năng chịu lạnh, hạn và mặn ở cây *Arabidopsis* biến đổi gen. *GmDREB5* liên quan đến khả năng chịu mặn.

Tuy nhiên, ở phân họ gen này, thông tin về chức năng của một vài gen *GmDREB* còn chưa đầy đủ, ví dụ như gen *GmDREB6*, *GmDREB7*...; đồng thời, can thiệp tăng cường biểu hiện (overexpression) gen *GmDREB* để tăng sự 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. Từ các nghiên cứu trên cho thấy rằng các protein DREB là nhân tố phiên mã quan trọng trong việc điều hòa các gen liên quan đến các stress phi sinh học. Do đó, các gen *DREB* có thể được sử dụng để cải thiện khả năng chống chịu của các loại cây trồng quan trọng trong nông nghiệp đối với các điều kiện bất lợi như hạn hán, độ mặn cao bằng kỹ thuật chuyển gen.

Chuyển gen là kỹ thuật được áp dụng trong nghiên cứu chức năng 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. 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. 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. Miền AP2 có khoảng 58 hoặc 59 amino acid, bao gồm một số amino acid liên kết với yếu tố phản ứng mất nước (DRE) hoặc hộp GCC. 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 stress phi sinh học. 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. Tuy nhiên, cho đến nay các báo cáo về phân tích biểu hiện mạnh của gen *GmDREB6* làm tăng

hàm lượng proline và tăng khả năng chống chịu các stress hạn và stress muối ở cây chuyển gen còn ít được công bố.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Các vật liệu thực vật: Giống thuốc lá K326 được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu thuốc lá. Giống đậu tương ĐT22 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ.

Các chủng vi khuẩn và các loại vector: Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và *A. tumefaciens* C58/pGV2206. Các vector được lưu giữ tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nhóm phương pháp phân tích phân họ gen *DREB* ở đậu tương

Phân tích phân họ gen *DREB* ở đậu tương được thực hiện bằng công cụ Tin sinh học. Dữ liệu trình tự gen *GmDREB* và vùng AP2 của protein DREB được khai thác từ Ngân hàng dữ liệu NCBI, trong đó có một số trình tự gen *DREB* được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam.

2.2.2. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen thực vật và phân tích hoạt động của vector biểu hiện gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá

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*, đoạn cmcy và vị trí cắt của cặp enzyme XbaI/ SacI (*GmDREB6_cmcy*); (2) Chèn cấu trúc vào vector chuyển gen thực vật pBI121 để tạo thành vector tái tổ hợp pBI121_ *GmDREB6*.

Vector tái tổ hợp được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng xung điện (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) để tạo ra vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp.

Biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* thông qua *A. tumefaciens* tái tổ hợp vào giống thuốc lá K326 được thực hiện theo phương pháp của Topping (1998). Sau khi nhiễm khuẩn, các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy và tái sinh *in vitro* tạo cây thuốc lá chuyển gen.

DNA tổng số tách chiết từ lá cây thuốc lá chuyển gen và cây WT theo phương pháp của Saghai-Marooof và cs (1984). Sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trong cây thuốc lá chuyển gen được xác định bằng phản ứng PCR với cặp mồi *XbaI-DREB6-F/ DREB6-SacI-R*.

2.2.3. Nhóm phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6*, *NtP5CS*, *NtCLC* trên cây thuốc lá chuyển gen

Phương pháp xử lý mẫu

Thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ duy trì ở mức 25°C và độ ẩm 80% với chu kỳ sáng và tối là 16h/ 20h. Cây thuốc lá kiểu dại (WT) và chuyển gen *GmDREB6*. Các cây thí nghiệm được tưới 50 ml NaCl 200 mM hàng ngày trong 3 tuần. Các cây đối chứng được tưới với lượng H₂O bằng nhau. Các mẫu lá được thu thập vào ngày cuối cùng của thí nghiệm để phân tích biểu hiện gen.

Phương pháp phân tích sự biểu hiện gen bằng phản ứng Real time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Các cặp mồi của gen tham chiếu *Actin* và gen đích *GmDREB6* được thiết kế và tổng hợp để sử dụng cho phản ứng qRT-PCR nhằm phân tích mức độ phiên mã và hoạt động của cấu trúc vector chuyển gen trong cây chuyển gen. Chu trình nhiệt của phản ứng qRT-PCR như sau: 95°C trong 3 phút, thực hiện khuếch đại trong 40 chu kỳ (95°C trong 10 giây, tiếp hợp mồi ở 60°C trong 20 giây và kéo dài ở 72°C trong 20 giây). Kết quả được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Q-Rex phiên bản 1.0.0 (QIAGEN, Đức), và phương pháp Livak's $-\Delta\Delta Ct$ của Livak được sử dụng để phân tích dữ liệu biểu hiện gen (Livak và Schmittgen, 2001).

2.2.4. Nhóm phương pháp chuyển gen *GmDREB6* vào đậu tương

Phương pháp biến nạp cấu trúc vector mang gen chuyển *GmDREB6* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua *A. tumefaciens* thực hiện theo phương pháp của Olhoft và cs (2006) và Nguyễn Thu Hiền và cs (2014).

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây đậu tương chuyển gen theo Saghai-Marooof và cs (1984).

Phân tích sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trong cây đậu tương chuyển gen bằng phản ứng PCR và RT-PCR được mô tả ở mục 2.2.2.

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS.

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN

Các thí nghiệm 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 4/2018 đến tháng 8/2021.

Thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen và phân tích sự biểu hiện gen ở cây chuyển 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.

Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học & Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. ĐẶC ĐIỂM VÀ SỰ PHÁT SINH CỦA PHÂN HỌ GEN *DREB* Ở ĐẬU TƯƠNG

3.1.1. Kết quả xác định các gen trong phân họ gen *DREB* ở đậu tương

Khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI đã xác định được 69 trình tự gen *GmDREB* khác nhau trên GenBank. Trong 69 trình tự gen *DREB* ở đậu tương khai thác từ dữ liệu NCBI thuộc về 18 gen *GmDREB*. Phang và cs (2008) cho rằng có hơn 10 gen *DREB* trong hệ gen đậu tương. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi xác định được 18 gen *GmDREB* có trong hệ gen đậu tương. Trong kết quả này, các gen *GmDREB* có từ 1 đến 8 copy (Bảng 3.1) phân bố trên 17 nhiễm sắc thể.

3.1.2. Sự phát sinh của các thành viên trong phân họ gen *GmDREB* ở đậu tương

Kết quả phân tích sự phát sinh gen thuộc phân họ *DREB* cho thấy 69 trình tự gen *GmDREB* được chia thành hai nhánh A, B với 6 nhóm được ký hiệu là I, II, III, IV, V, VI.

Bảng 3.1. Số bản copy và vị trí của mỗi gen *GmDREB* trong hệ gen cây đậu tương

TT	Tên gen	Số bản copy	Vị trí của gen trên nhiễm sắc thể số
1	<i>GmDREB</i>	1	13
2	<i>GmDREB1</i>	2	9, 10
3	<i>GmDREB1B</i>	1	10
4	<i>GmDREB1D</i>	1	13
5	<i>GmDREB1E</i>	3	1,10, 17
6	<i>GmDREB1F</i>	4	5, 11, 12, 13
7	<i>GmDREB2</i>	2	4,6
8	<i>GmDREB2A2</i>	1	14
9	<i>GmDREB2C-like</i>	2	2, 6
10	<i>GmDREB2D</i>	2	4,6
11	<i>GmDREB2F</i>	4	2, 3, 10, 19
12	<i>GmDREB3</i>	8	1, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 17
13	<i>GmDREB5</i>	2	12, 13
14	<i>GmDREB6</i>	1	5
15	<i>GmDREB7</i>	1	20
16	<i>GmDREBa</i>	1	12
17	<i>GmAP2-2</i>	1	4
18	<i>GmAP2-Ile-DBDP</i>	1	16

Nhóm I gồm các gen *GmDREB1* (B, D, E, F), nhóm II gồm các gen *GmDREB1* và *GmDREB7*, nhóm III gồm các gen *GmDREB3* và *GmDREB6*, nhóm IV có các gen *GmDREB2* và một gen *GmDREB1*, nhóm V gồm các gen *GmDREB5*, nhóm VI gồm các gen *GmDREB* và *GmDREB2*. Như vậy, có 4 nhóm chứa các cặp gen *GmDREB1-GmDREB7* (nhóm II), *GmDREB3-GmDREB6* (nhóm III), *GmDREB2-GmDREB1* (nhóm IV) và *GmDREB-GmDREB2* (nhóm VI). Điểm chú ý là một số trình

Kết quả phân tích sự tiến hóa miền AP2 của protein DREB ở đậu tương cho thấy cây phát sinh của miền AP2 phân thành 4 nhánh, trong đó có một nhánh chỉ có một trình tự AP2 của protein DREB2 (AAY89658) và ba nhánh còn lại, mỗi nhánh có một nhóm ký hiệu là I, II, III (Hình 3.3). Nhóm I gồm 29 trình tự AP2 của các loại protein DREB1, DREB1B, DREB1D, DREB1E, DREB1F, DREB3, DREB6, AP2-2, AP2-Ile-DBDP; nhóm II gồm 25 trình tự AP2 của các loại protein DREB, DREBA, DREB2A2, DREB2C-like, DREB3, DREB5; nhóm III gồm 14 trình tự AP2 của các loại protein DREB2 (13 trình tự) và DREB1 (1 trình tự).

3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN *GmDREB6* VÀ PHÂN TÍCH HOẠT ĐỘNG CỦA VECTOR TRÊN CÂY THUỐC LÁ

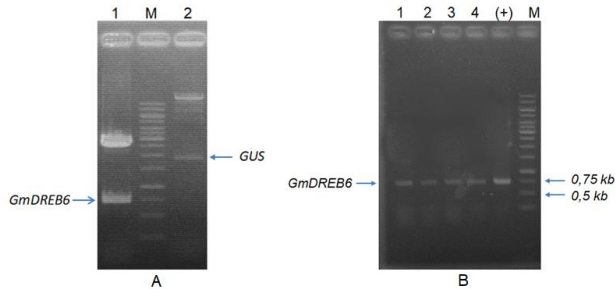
3.2.1. Thiết kế vector chứa cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6*

Tổng hợp GmDREB nhân tạo

Dựa trên thông tin của gen *GmDREB6* có mã số EF551166 trên GenBank, gen *GmDREB6* nhân tạo được thiết kế với kích thước 741 bp. Trong đó, trình tự mã hóa của 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*).

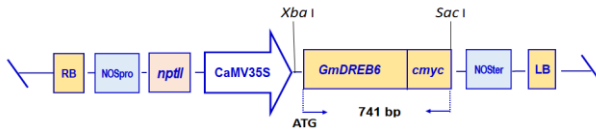
Tạo vector chuyển gen mang gen GmDREB6

Vector chuyển gen pBI121 chứa gen *GUS* (*pBI121_GUS*). Cặp enzyme *XbaI/SacI* được sử dụng để cắt và loại bỏ gen *GUS* khỏi vector *pBI121_GUS*, sau đó chèn gen chuyển *GmDREB6* vào vector chuyển gen *pBI121*, tạo ra cấu trúc mang gen chuyển *pBI121_GmDREB6*. Kết quả kiểm tra các thí nghiệm tạo vector chuyển gen được trình bày ở hình 3.6. Plasmid *pBI121_GmDREB6* tách chiết từ *E.coli* DH5 α đã được biến nạp vào *A.tumefaciens*. Sau đó *A.tumefaciens* tái tổ hợp được nhân dòng, chọn lọc và kiểm tra. Chọn ngẫu nhiên 4 dòng khuẩn lạc và đem phân tích bằng colony-PCR nhân bản gen *GmDREB6*, kết quả thụ được một băng DNA ứng với kích thước của gen chuyển *GmDREB6* (Hình 3.7). 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 3.6. A- Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt từ vector *pUC18_GmDREB6*, *pBI121_GUS* bằng cặp enzyme *SacI/XbaI* (A) 1: *pUC18_GmDREB6*; M: Thang DNA 1kb; 2: *pBI121_GUS*. B- Hình ảnh điện di kiểm tra gen *GmDREB6* trong cấu trúc *pBI121_GmDREB6* từ khuẩn lạc *E.coli DH5a* tái tổ hợp *E.coli DH5a* sau biến nạp. M: Thang DNA 1kb; (+): Gen *GmDREB6* được khuếch đại từ *pUC18_GmDREB6*; 1, 2, 3, 4: Gen *GmDREB6* được khuếch đại từ các khuẩn lạc *E.coli DH5a*.

Như vậy, 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 cấu trúc gen chuyển *pBI121_GmDREB6*. Đặc điểm của vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* được thể hiện ở hình 3.8.



Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector *pBI121_GmDREB6* được sử dụng để chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* [126].

LB và RB: bờ trái và bờ phải của T-DNA; *nptII*: neomycin-phosphotransferase II; *CaMV35S*: promoter 35S của virus khảm súp lơ; *GmDREB6_cmyc*: Gen DREB6 của đậu tương được gắn một trình tự nucleotide mã hóa peptide *cmyc*; *XbaI* và *SacI*: Vị trí nhận biết và cắt của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI*

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

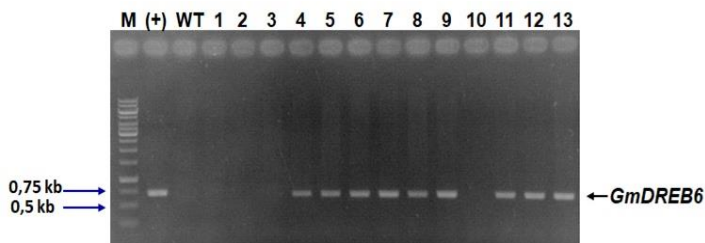
Các mảnh lá thuốc lá *in vitro* có kích thước khoảng 1cm² được ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens*. Sau đó các mảnh lá được nuôi cấy

trên môi trường đồng nuôi cấy trong tối. Các mẫu biến nạp tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường tái sinh đa chồi, môi trường ra rễ để tạo ra cây thuốc lá chuyển gen

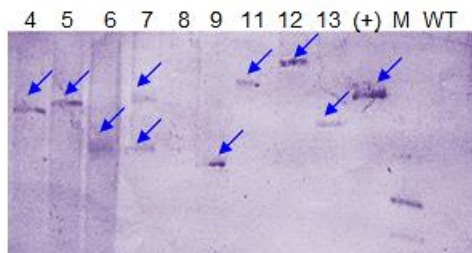
Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* vào cây thuốc lá cho thấy, từ 180 mẫu trong ba lần biến nạp có 539 chồi được tạo ra trong môi trường tái sinh đa chồi và môi trường kéo dài chồi. Kết quả chọn được 101 cây con chuyển sang trồng trên chậu, trong đó 48 cây được chuyển đến nhà lưới chăm sóc.

Kết quả phân tích PCR 13 cây biến nạp với cặp mồi XbaI-DREB6-F/DREB6-SacI-R thu được 9 cây dương tính với sự xuất hiện của một băng DNA có cùng kích thước với gen chuyển *GmDREB6* (741 bp). Cây chuyển gen dương tính PCR trong thế hệ T0 được ký hiệu là T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13.

Tiến hành phân tích Southern blot 9 cây dương tính với PCR để xác nhận sự hợp nhất của gen chuyển *GmDREB6* vào hệ gen cây thuốc lá biến nạp, kết quả cho thấy có 8 cây T0 (T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13) cho kết quả dương tính với phản ứng lai Southern, cây T0-8 không xuất hiện băng DNA (Hình 3.11). Tiếp tục phân tích sự biểu hiện của gen *GmDREB6* trên 8 cây thuốc lá chuyển gen ở mức phiên mã dương tính với Southern blot bằng phản ứng RT-PCR, kết quả cho thấy có 5 cây T0 được phiên mã để tạo ra mRNA, đó là các cây T0-5, T0-7, T0-9, T0-12, T0-13.



Hình 3.10. 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 biến nạp; 1-13: Các cây chuyển gen thế hệ T0 (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13).



Hình 3.11. 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 biến nạp; Các làn 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 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)

Cấu trúc *35S-GmDREB6-cmyc* trong vector tái tổ hợp *pBI121* đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá qua trung gian *A.tumefaciens*. Gen chuyển *GmDREB6* được chứng minh là đã hợp nhất vào hệ gen và được biểu hiện ở cây thuốc lá chuyển gen ở mức độ phiên mã.

3.3. PHÂN TÍCH SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN *GmDREB6*, *NtP5CS*, *NtCLC* TRÊN CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN BẰNG REAL TIME QRT-PCR

3.3.1. Xử lý mặn các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* và cây WT

Trong 5 dòng cây T0 (T0-5, T0-7, T0-9, T0-12, T0-13) cho kết quả phiên mã tổng hợp mRNA, chọn 3 dòng cây sinh trưởng phát triển tốt là T0-5, T0-9 và T0-13 để tiếp tục phân tích biểu hiện gen trong điều kiện stress muối bằng Real time RT-PCR. Các dòng chuyển gen T0-5, T0-9 và T0-13 lần lượt được ký hiệu là L1, L3 và L9. Các dòng WT và ba dòng chuyển gen L1, L3, L9 có sự sinh trưởng, phát triển bình thường và hình thái đồng đều đã được chọn để xử lý stress mặn trong buồng trồng cây. Các chậu cây thuốc lá được tưới 50 ml NaCl 200 mM hàng ngày trong 3 tuần, sau đó mức độ biểu hiện gen được phân tích bằng phản ứng qRT-PCR. Đối chứng là các dòng chuyển gen *GmDREB6* và cây không chuyển gen được tưới 50 ml H₂O hàng ngày (Hình 3.13).

Quan sát hình thái thí nghiệm và đối chứng sau 3 tuần cho thấy, ở lô tưới nước (Hình 3.13A) các cây chuyển gen L1, L3, L9 có hình thái và màu sắc lá, chiều cao cây tương tự nhau; nhưng ở lô thí nghiệm (Hình 3.13B)

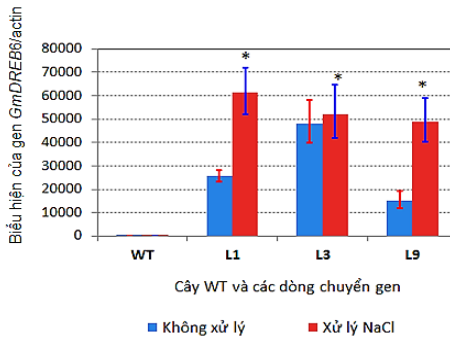
tưới 50 ml NaCl 200 mM thấy cây L1 biểu hiện sinh trưởng mạnh hơn các cây L3, L9 và WT. Cây WT sinh trưởng kém hơn và có lá nhỏ, vàng ở những lá gần gốc, trong khi các cây chuyển gen L1, L3, L9 sinh trưởng bình thường, lá xanh, to tương tự ở lô đối chứng tưới nước. Sự biểu hiện này cũng cho thấy sự phát triển bình thường của các dòng thuốc lá chuyển gen khi bị stress mặn, trong khi các cây WT bị vàng lá, sinh trưởng kém và ngừng sinh trưởng.



Hình 3.13. Hình thái cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* và cây không chuyển gen khi tưới H_2O và NaCl trong buồng sinh trưởng sau 3 tuần. A: tưới 50 mL H_2O hàng ngày; B: tưới 50 ml NaCl 200 mM hàng ngày. Dòng thuốc lá chuyển gen L1, L3, L9: *GmDREB6*; WT: cây thuốc lá không chuyển gen.

3.3.2. Phân tích mức độ biểu hiện của các gen *GmDREB6*, *NtP5CS* và *NtCLC* phản ứng với stress mặn ở các dòng thuốc lá chuyển gen

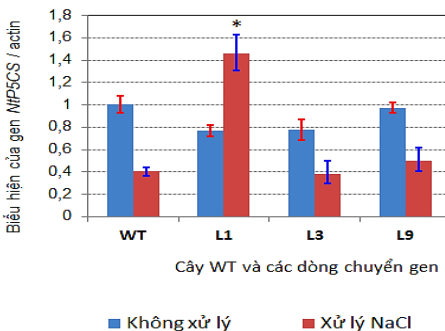
Các dòng thuốc lá chuyển gen L1, L3 và L9 được sử dụng để phân tích mức độ biểu hiện của các gen *GmDREB6*, *NtP5CS* và *NtCLC* bằng phản ứng qRT-PCR để xác định vai trò của gen *GmDREB6* từ đầu tương đối với sự biểu hiện của các gen *NtP5CS* và *NtCLC* nội sinh ở cây thuốc lá. Trong điều kiện bình thường, gen chuyển *GmDREB6* biểu hiện quá mức ở các dòng chuyển gen trong khi không quan sát thấy sự biểu hiện ở cây WT. Khi xử lý mặn, mức độ biểu hiện gen *GmDREB6* trong các dòng thuốc lá chuyển gen L1, L3, L9 đều tăng lên so với trong điều kiện tưới nước bình thường (Hình 3.14).



Hình 3.14. Mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6* ở các dòng thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng *Actin* làm gen tham chiếu. ($P < 0,05$).

Đặc biệt, các dòng chuyển gen L1 và L9 có mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6* cao, tăng 2,40 lần (L1) đến 3,22 lần (L9) so với điều kiện không xử lý muối. Như vậy, những kết quả này chỉ ra rằng sự biểu hiện của gen *GmDREB6* có liên quan trực tiếp đến phản ứng với stress mặn của cây thuốc lá.

Phân tích biểu hiện gen *NtP5CS* của cây thuốc lá chuyển gen (gen nội sinh), kết quả trên hình 3.15 cho thấy, trong điều kiện tưới nước bình thường (không xử lý NaCl), không có sự khác biệt về mức độ phiên mã giữa các dòng thuốc lá chuyển gen so với cây WT.

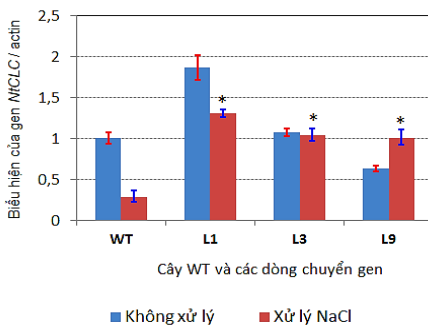


Hình 3.15. Mức độ biểu hiện của gen *NtP5CS* ở các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng *Actin* làm gen tham chiếu. WT: cây thuốc lá không biến nạp; L1, L3 và L9: dòng thuốc lá chuyển gen. Dấu (*) trên mỗi cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Trong điều kiện stress mặn, ở các dòng chuyển gen L1 và L9 có mức độ phiên mã của gen *P5CS* tăng từ 1,24 đến 3,60 (lần) so với ở cây WT. Trong số 3 dòng thuốc lá chuyển gen, dòng L1 có mức phiên mã của gen *P5CS*

tăng 1,9 lần so với dòng L1 không xử lý, trong khi dòng L3 và L9 không cho thấy sự thay đổi biểu hiện này.

Tiếp tục phân tích biểu hiện của gen *NtCLC* trên các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* L1, L3, L9 kết quả cho thấy, trong điều kiện không xử lý NaCl, chỉ có dòng thuốc lá chuyển gen L1 có mức phiên mã cao hơn so với cây WT; còn khi xử lý bằng NaCl, các dòng chuyển gen đều có mức phiên mã tăng lên, dao động từ 3,65 đến 4,54 (lần) so với với cây WT ($P < 0,05$) (Hình 3.16).



Hình 3.16. Mức độ biểu hiện của các gen *NtCLC* ở các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng *Actin* làm gen tham chiếu. WT: cây thuốc lá không biến nạp; L1, L3 và L9: dòng thuốc lá chuyển gen. Dấu (*) trên mỗi cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.3.3. Thảo luận kết quả biểu hiện gen *GmDREB6*, *NtP5CS*, *NtCLC* ở các dòng thuốc lá chuyển gen

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng phân họ DREB đóng một vai trò quan trọng trong phản ứng chống chịu mặn của thực vật thông qua con đường không phụ thuộc ABA. Sự biểu hiện tăng cường của gen *DREB* đã kích hoạt sự biểu hiện của các gen đáp ứng chống chịu trong điều kiện stress phi sinh học. Trong kết quả nghiên cứu trên cây thuốc lá chuyển gen của chúng tôi ở điều kiện tưới 50 ml NaCl 200 mM hàng ngày trong 3 tuần, các dòng thuốc lá chuyển gen đã biểu hiện mức độ phiên mã của gen *GmDREB6* tăng từ 108,03% đến 321,95% so với cây chuyển gen trong điều kiện tưới nước bình thường ($P < 0,05$). Kết quả này khẳng định sự

phản ứng mạnh mẽ của gen *GmDREB6* khi cây thuốc lá chuyển gen nhận được tín hiệu stress mặn từ môi trường.

Gen *GmDREB6* trong hệ gen đậu tương (gen có ID là 100101914) nằm trên nhiễm sắc thể số 5. Vùng mã hóa của gen *GmDREB6*, có kích thước 693 bp, mã hóa protein DREB6 gồm 230 amino acid. Protein DREB6 chứa miền AP2 có 59 amino acid và trình tự amino acid liên kết với sợi DNA của promoter có 11 amino acid (.rg.r.r.w.k... e.r r.w.t.) [97]. Promoter khởi động phiên mã của gen *GmDREB6* chứa các yếu tố *cis* GT-1 và DRE (DRE (-1113), GT-1 (-133, -1398, -1488, -1560, -1993) và nhân tố phiên mã DREB6 có thể được liên kết với miền GT-1 hoặc DRE trong vùng khởi động của các gen chức năng. Các yếu tố *cis* trong trình tự khởi động của gen *GmP5CS* ở đậu tương là GT-1 (-56, -1243, 1641) và GCC (-1899) và như vậy nhân tố phiên mã mDREB6 của đậu tương có thể liên kết với GT-1 trong vùng promoter của gen *P5CS*. Nguyễn và cs (2019) đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức của gen *GmDREB6* đã tăng cường hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* ở cây đậu tương chuyển gen. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá chuyển gen đã cho thấy, khi cây thuốc lá nhận được tín hiệu về độ mặn của môi trường, mức độ phiên mã của gen *GmDREB6* tăng lên 321,95% so với ở cây không được xử lý bằng NaCl.

Protein chloride channel (CLC) là anion chất mang quan trọng tồn tại trong vi khuẩn, nấm men, thực vật và động vật. Các ion Cl^- rất quan trọng đối với một số quá trình sinh học trong tế bào, chẳng hạn như khử cực màng, điều chỉnh thể tích tế bào, khả năng chống lại stress muối và khả năng chịu đựng kim loại. Người ta suy đoán rằng protein CLC có thể tham gia vào quá trình vận chuyển Cl^- qua các bào quan trong tế bào. Sự biểu hiện của protein CLC làm tăng sự vận chuyển Cl^- từ tế bào chất vào không bào và tạo ra khả năng chống chịu NaCl trong tế bào.

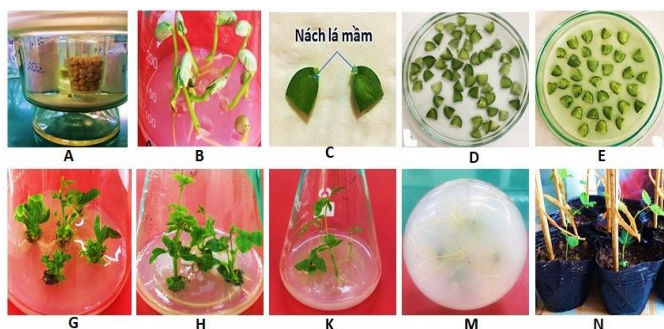
Kết quả phân tích biểu hiện của các gen *GmDREB6*, *NtP5CS* và *NtCLC* trên cây thuốc lá có thể thấy gen *GmDREB6* là một ứng cử viên tiềm năng có thể sử dụng để cải thiện khả năng chịu mặn của cây trồng, mở ra hướng nghiên cứu phát triển cây trồng chịu mặn trong bối cảnh biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng mực nước biển.

3.4. BIẾN NẠP CẤU TRÚC MANG GEN *GmDREB6* THÔNG QU A *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

3.4.1. Biến nạp và tạo cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6* từ giống đậu tương ĐT22

Giống đậu tương DT22 được trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam, có thời gian sinh trưởng ngắn và có khả năng kháng bệnh phần trắng, tuy nhiên, giống đậu tương DT22 cùng với các giống DT12, DT94, W82, DT2003, DT2001, DT51, D2101, DT22, DT96, DT95, D8, DT90, DT83, DT84, DT30 được đánh giá có khả năng chịu mặn thấp. Trong nghiên cứu này, giống đậu tương Việt Nam DT22 được chọn làm đối tượng nhận gen để thực hiện thí nghiệm chuyển gen *GmDREB6* trong mục đích nâng cao khả năng chịu mặn của giống đậu tương này.

Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* thông qua lây nhiễm *A.tumefaciens* qua rách lá mầm được thể hiện ở hình 3.17. Trong 450 mẫu biến nạp, lặp lại 3 lần đã có 185 mẫu tạo chồi và tổng số chồi được tạo thành là 583 chồi. Chọn 109 chồi chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả chuyển 53 dòng cây T0 ra trồng trên giá thể và thu được 12 dòng cây T0 sống sót trong điều kiện nhà lưới.

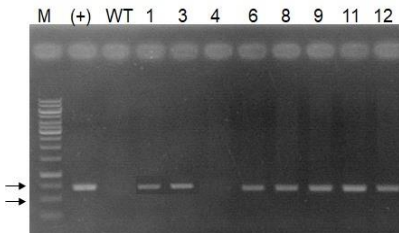


Hình 3.17. Hình ảnh quá trình biến nạp và tái sinh cây đậu tương chuyển gen. **A:** Hạt đậu tương DT22 được khử trùng bằng khí clo từ hỗn hợp javen 100 ml và HCl 3 ml; **B:** Hạt nảy mầm trên môi trường GM; **C:** Lá mầm thu từ hạt nảy mầm; **D:** Lá mầm đã gây tổn thương ngâm trong dịch *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* trong 30 phút. **E:** Các lá mầm biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM trong tối, ở 25°C trong thời gian 5 ngày; **G:** Các lá mầm được đặt trên môi trường cảm ứng tạo đa chồi SIM1, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 50mg/l trong 2 tuần (lần 1). Sau đó các lá mầm được chuyển sang môi trường SIM2 đặc, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 75mg/l trong 3 tuần (lần 2); **H:** Các chồi sống sót trong môi trường chọn lọc bằng kanamycin được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 50mg/l; **K, M:** Các chồi sống sót sau chọn lọc được chuyển sang môi trường tạo rễ RM, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 50mg/l để tạo cây hoàn chỉnh; **N:** Các cây có

bộ rễ phát triển được chuyển ra trồng trên giá thể có tỷ lệ 2 đất thịt: 1 trấu hun : 2 sơ dừa trong nhà lưới.

3.4.2. Phân tích sự hiện diện và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trên cây đậu tương chuyển gen

Các cây đậu tương biến nạp ở thế hệ T0 trong nhà lưới được sử dụng để phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen bằng PCR với cặp mồi *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R*. Kết quả phân tích điện di cho thấy băng DNA có kích thước khoảng gần 750 bp xuất hiện ở 8 dòng đậu tương chuyển gen số 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, trong khi các dòng số 2, 5, 7, 10 không xuất hiện băng DNA. Tiếp tục phân tích biểu hiện phiên mã của 8 cây dương tính với PCR bằng phản ứng RT-PCR với cặp mồi *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R*, kết quả thể hiện ở hình 3.19. Trong 8 cây T0 mang phân tích RT-PCR có 7 cây dương tính, đó là các cây T0 =1, T0-3, T0-6, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12. Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* đã biểu hiện phiên mã tổng hợp mRNA.



Hình 3.19. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cấu trúc chứa gen *GmDREB6* trong hệ gen các cây đậu tương chuyển gen. M: thang DNA 1 kb; WT; cây đậu tương không biến nạp; (+) plasmid *pBI121_GmDREB6* làm đối chứng dương; 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12: các dòng cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6*.

3.4.3. Thảo luận kết quả chuyển gen *GmDREB6* ở đậu tương

Nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương nhờ *A. tumefaciens* chứa cấu trúc mang gen chuyển qua nách lá mầm đã tổn thương đã được công bố bởi nhiều tác giả. Ở Việt Nam, Trần Thị Cúc Hòa (2007), Nguyễn Thị Thúy Hương (2011), Nguyễn Thu Hiền (2011), Lò Thị Mai Thu (2014), Lò Thanh Sơn (2015), Nguyễn HQ và cs (2019), Phạm và cs (2020), cũng đã thành công trong chuyển gen ở đậu tương bằng cách lây nhiễm *A. tumefaciens* mang cấu trúc gen chuyển qua nách lá mầm tổn thương. Bằng phương pháp này, chúng tôi cũng đã thành công biến nạp vector

pBI121_GmDREB6 vào giống đậu tương Việt Nam ĐT22 với số chồi tái sinh đạt trung bình 3,15 chồi/mẫu. Kết quả 3 lần chọn lọc đã chọn được 53 cây đậu tương trồng trên giá thể. Sử dụng PCR với cặp mồi *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R* đã xác nhận gen chuyển *GmDREB6* đã có mặt trong hệ gen của 8 cây chuyển gen T0.

Trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen có gen *GmDREB6* nội tại và gen chuyển *GmDREB6*. Vùng mã hóa của gen nội tại và gen chuyển *GmDREB6* đều có kích thước 693 bp, mã hóa 230 amino acid. Nếu sử dụng PCR với cặp mồi được thiết kế để khuếch đại vùng mã hóa thì kết quả duy nhất chỉ có đoạn DNA khoảng 0,7 kb và không thể xác định được gen chuyển *GmDREB6* có được hợp nhất vào hệ gen của cây đậu tương được chuyển gen hay không. Do vậy, để phân tích cây đậu tương chuyển gen, chúng tôi thiết kế cặp mồi PCR nhằm nhân bản đoạn DNA bao gồm gen *GmDREB6*, các trình tự chứa điểm cắt của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI*. Trong vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*, cấu trúc *GmDREB6-c-myc* bao gồm đoạn gen *GmDREB6*, chứa vùng mã hóa 693 bp, đoạn 8 bp (GCTCTAGA) ở đầu 5' chứa vị trí cắt cho *XbaI*, trình tự có kích thước 33 bp mã hóa cho kháng nguyên c-myc và đoạn 7 bp (GAGCTCG) ở 3' cuối chứa vị trí cắt cho *SacI*. Như vậy, cấu trúc *pBI121_GmDREB6_cmyc* có kích thước là 741 bp. Cặp mồi PCR *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R* được thiết kế để khuếch đại cấu trúc *GmDREB6-c-myc* và kết quả kiểm tra bằng điện di trên gel agarose đã xuất hiện băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 0,75 bp (Hình 3.15). Đồng thời, kết quả phân tích RT-PCR đã xác định được gen chuyển *GmDREB6* đã biểu hiện ở 7 cây đậu tương T0. Hiệu suất chuyển gen *GmDREB6* ở giai đoạn phân tích PCR đạt 1,78% và giai đoạn phân tích RT-PCR đạt 1,56%.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1.1. Mười tám gen *GmDREB* thuộc phân họ *DREB* trong hệ gen đậu tương đã xác định được từ cơ sở dữ liệu NCBI. Các bản copy của các gen *GmDREB* phân bố trên 17 nhiễm sắc thể, trong đó *GmDREB3* có 8 copy, còn lại các gen *GmDREB* khác có 1-4 copy. Miền AP2 của protein DREB

phổ biến có 59-60 amino acid và motif PTPEMAARAYDVAALALKGPSARLNFPEL có ở tất cả các protein DREB của đậu tương. AP2 chứa 11 điểm liên kết với promoter của các gen chức năng, với 4 dạng và phổ biến là RGRRWKERRWT (có ở 13/18 protein DREB).

1.2. Vector chuyển gen thực vật *pBI121_GmDREB6* chứa cấu trúc 35S-*GmDREB6-cmyc* được thiết kế và biến nạp vào cây thuốc lá. Sự hợp nhất và sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB6* trong hệ gen cây thuốc lá chuyển gen đã được xác định bằng phân tích Southern blot và RT-PCR.

1.3. Bằng phân tích qRT-PCR đã chứng minh được sự biểu hiện của gen *GmDREB6* từ đậu tương đã làm tăng mức độ phiên mã các gen *NtP5CS* và *NtCLC* của cây thuốc lá chuyển gen trong điều kiện xử lý mặn. Các dòng thuốc lá chuyển gen L1 và L9 có mức phiên mã của gen *GmDREB6* tăng từ 2,40 đến 3,22 (lần) so với điều kiện không xử lý mặn. So với cây WT, mức độ phiên mã của gen *NtP5CS* ở các dòng chuyển gen tăng từ 1,24 - 3,60 lần và của gen *NtCLC* tăng 3,65 - 4,54 (lần) ($P < 0,05$). Sự tăng cường biểu hiện đồng thời ở cả gen chuyển *GmDREB6* và hai gen nội sinh, *NtP5CS* và *NtCLC*, đã được xác nhận ở các dòng thuốc lá chuyển gen L1.

1.4. Cấu trúc mang gen *GmDREB6* đã biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT22 qua nách lá mầm nhờ *A.tumefaciens*, tái sinh được 12 cây biến nạp sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới. Phân tích phân tử các dòng chuyển gen *GmDREB6* ở thể hệ T0 xác định được 8/12 dòng dương tính với PCR và gen chuyển *GmDREB6* ở 7 dòng cây cho kết quả biểu hiện ở mức phiên mã. Hiệu suất chuyển gen *GmDREB6* ở giai đoạn phân tích PCR đạt 1,78% và giai đoạn phân tích RT-PCR đạt 1,56%.

2. Đề nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu để làm rõ chức năng của một số gen *DREB* trong hệ gen đậu tương bằng thực nghiệm. Tiếp tục phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp của các dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* để chọn tạo dòng đậu tương có khả năng kháng mặn cao.