

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, tháng 10/2021

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS.TS. Chu Hoàng Mậu**
- 2. TS. Phạm Thị Thanh Nhân**

Thái Nguyên, tháng 10/2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu và TS. Phạm Thị Thanh Nhân (Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên). Các kết quả được trình bày trong luận án là trung thực một phần đã được công bố trên các Tạp chí Khoa học và Công nghệ quốc gia và quốc tế, phần còn lại chưa công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Tất cả các nội dung trích dẫn trong luận án đều ghi rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2021

TÁC GIẢ

Phutthakone VACIAXA

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu và TS. Phạm Thị Thanh Nhân đã trực tiếp hướng dẫn và thường xuyên chia sẻ, động viên khích lệ để tôi có được sự tự tin và lòng đam mê khoa học giúp tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các thầy cô giáo và cán bộ Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học thuộc Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án. Tôi xin cảm ơn những ý kiến đóng góp quý báu trong các buổi seminar khoa học, báo cáo chuyên đề và báo cáo tiểu luận tổng quan luận án.

Trong quá trình thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình của tập thể cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học. Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô giáo và cán bộ Khoa Sinh học, các thầy cô giáo và cán bộ bộ phận đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện luận án và hoàn thành khoá học này.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo Trường Cao đẳng Sư phạm Khang Khay, Xiêng Khoảng, Lào đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành khóa học tại Việt Nam.

Tôi rất biết ơn những người thân trong gia đình, các bạn bè đã luôn động viên, quan tâm, tạo mọi điều kiện cho tôi học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2021

TÁC GIẢ

Phutthakone VACIAXA

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục bảng trong luận án	vi
Danh mục hình trong luận án	vii
Danh mục chữ viết tắt trong luận án	ix
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	3
4. Những đóng góp mới của luận án	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án	5
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN, CHỊU MẶN ...	6
1.1.1. Cây đậu tương	6
1.1.2. Đặc tính chống chịu hạn, mặn của cây đậu tương.....	10
1.1.2.1. Tác động của hạn và cơ chế phân tử của tính chịu hạn	11
1.1.2.2. Tác động của mặn và cơ chế chịu mặn ở cây đậu tương.....	14
1.2. NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB Ở THỰC VẬT VÀ CÂY ĐẬU TƯƠNG	20
1.2.1. Đặc điểm của phân họ DREB ở thực vật và cây đậu tương	20
1.2.2. Vai trò của DREB trong việc điều chỉnh phản ứng với stress phi sinh học ở thực vật.....	27
1.2.3. Khả năng chống chịu stress thông qua việc biểu hiện mạnh nhân tố phiên mã DREB	31

1.3. KỸ THUẬT CHUYỂN GEN TRONG NGHIÊN CỨU CẢI THIẾN ĐẶC TÍNH CHỐNG CHỊU CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG	37
1.3.1. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen thông qua <i>A. tumefaciens</i>	37
1.3.2. Nghiên cứu cải thiện khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh ở cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen	41
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	46
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU	46
2.1.1. Vật liệu	46
2.1.2. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	48
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	48
2.2.1. Nhóm phương pháp phân tích phân họ gen <i>DREB</i> ở cây đậu tương.	48
2.2.2. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen thực vật và phân tích hoạt động của vector biểu hiện gen <i>GmDREB6</i> trên cây thuốc lá	49
2.2.3. Nhóm phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của gen <i>GmDREB6</i> , <i>NtP5CS</i> , <i>NtCLC</i> trên cây thuốc lá chuyển gen.....	55
2.2.4. Nhóm phương pháp chuyển gen <i>GmDREB6</i> vào cây đậu tương	58
2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu	61
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN	61
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	62
3.1. ĐẶC ĐIỂM VÀ SỰ PHÁT SINH CỦA PHÂN HỌ GEN <i>DREB</i> Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG	62
3.1.1. Kết quả xác định các gen trong phân họ gen <i>DREB</i> ở cây đậu tương	62
3.1.2. Sự phát sinh của các thành viên trong phân họ gen <i>GmDREB</i> ở cây đậu tương	65
3.1.3. Cây phát sinh miền AP2 ở đậu tương	67

3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN <i>GmDREB6</i> VÀ PHÂN TÍCH HOẠT ĐỘNG CỦA VECTOR TRÊN CÂY THUỐC LÁ.....	71
3.2.1. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen <i>GmDREB6</i> ...	71
3.2.2. Biến nạp cấu trúc <i>pBI121_GmDREB6</i> vào mô cây thuốc lá	76
3.3. PHÂN TÍCH SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN <i>GmDREB6</i> , <i>NtP5CS</i> , <i>NtCLC</i> TRÊN CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN BẰNG REAL TIME qRT-PCR	80
3.3.1. Xử lý mặn các dòng thuốc lá chuyển gen <i>GmDREB6</i> và cây WT ..	81
3.3.2. Phân tích mức độ biểu hiện của các gen <i>GmDREB6</i> , <i>NtP5CS</i> và <i>NtCLC</i> phản ứng với stress mặn ở các dòng thuốc lá chuyển gen	81
3.3.3. Thảo luận kết quả biểu hiện gen <i>GmDREB6</i> , <i>NtP5CS</i> , <i>NtCLC</i> ở các dòng thuốc lá chuyển gen	85
3.4. BIẾN NẠP CẤU TRÚC MANG GEN <i>GmDREB6</i> THÔNG QUA <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22...	88
3.4.1. Biến nạp và tạo cây đậu tương chuyển gen <i>GmDREB6</i> từ giống đậu tương ĐT22	88
3.4.2. Phân tích sự hiện diện và sự phiên mã của gen chuyển <i>GmDREB6</i> trên cây đậu tương chuyển gen	92
3.4.3. Thảo luận kết quả chuyển gen <i>GmDREB6</i> ở cây đậu tương	93
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	95
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	97
TÀI LIỆU THAM KHẢO	98
PHỤ LỤC	122

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Sự biểu hiện quá mức của gen <i>DREB</i> phản ứng với các stress phi sinh học ở các cây chuyển gen	32
Bảng 1.2 Một số gen <i>DREB</i> được sử dụng trong chuyển gen nhằm nâng cao khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học của một số cây trồng và đậu tương	41
Bảng 2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn	50
Bảng 2.2. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá chuyển gen ..	51
Bảng 2.3. Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR sử dụng trong phân tích cây thuốc lá chuyển gen	52
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR	53
Bảng 2.5. Trình tự nucleotide của các cặp mồi được sử dụng trong phản ứng Realtime RT-PCR.....	57
Bảng 2.6. Môi trường nảy mầm, đồng nuôi cấy, cảm ứng tạo chồi, tái sinh cây chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22	59
Bảng 3.1. Số bản copy và vị trí của mỗi gen <i>GmDREB</i> trong hệ gen cây đậu tương	64
Bảng 3.2. So sánh các điểm liên kết trong miền AP2 với sợi DNA vùng promoter của 18 thành viên trong phân họ nhân tố phiên mã DREB ở cây đậu tương.....	69
Bảng 3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc <i>pBI121-GmDREB6</i> vào mô cây thuốc lá.....	77
Bảng 3.4. Kết quả biến nạp gen <i>GmDREB6</i> vào giống đậu tương ĐT22.....	91

DANH MỤC CÁC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Một số đặc điểm hình thái cây đậu tương (<i>Glycine max</i>)..	7
Hình 1.2. Các giai đoạn sinh trưởng của cây đậu tương	8
Hình 1.3. Sơ đồ con đường dẫn truyền tín hiệu trong tế bào khi bị stress mặn ở thực vật bậc cao	16
Hình 1.4. Vị trí của gen <i>GmDREB1</i> có gene ID: 547622 trên NST số 9 và <i>GmDREB1</i> có gene ID: 547642 trên NST số 14 của cây đậu tương	26
Hình 1.5. Vị trí của gen <i>GmDREB2</i> trên NST số 6 của cây đậu tương	26
Hình 1.6. Vị trí của gen <i>GmDREB6</i> trên NST số 5 của cây đậu tương ...	27
Hình 2.1. Hình ảnh của một số giai đoạn phát triển ở giống đậu tương ĐT22 được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen.....	44
Hình 3.1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa giữa các thành viên của phân họ gen <i>DREB</i> ở đậu tương được thiết lập dựa trên trình tự gen <i>GmDREB</i> theo phương pháp Maximum Likelihood và JTT matrix-based model trong MEGAX.....	66
Hình 3.2. So sánh trình tự amino acid miền AP2 của các protein trong phân họ DREB ở đậu tương	68
Hình 3.3. Cây phát sinh miền AP2 của phân họ protein DREB ở đậu tương được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid miền AP2 theo phương pháp Maximum Likelihood trong MEGAX và JTT matrix-based model với bootstrap được lặp lại 1000 lần.....	70
Hình 3.4. Trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> nhân tạo	72

Hình 3.5. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen <i>pBI121_GmDREB6</i>	73
Hình 3.6. Hình ảnh điện di của sản phẩm cắt từ vector <i>pPU18_GmDREB6</i> và <i>pBI121_GUS</i> với cặp enzyme <i>SacI/XbaI</i> ...	74
Hình 3.7. Hình ảnh điện di kiểm tra gen chuyển <i>GmDREB6</i> bằng colony-PCR từ các khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> AGL1.....	75
Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector <i>pBI121_GmDREB6</i> được sử dụng để chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
Hình 3.9. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp cấu trúc mang gen <i>GmDREB6</i> và tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua <i>A.tumefaciens</i>	76
Hình 3.10. 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	78
Hình 3.11. 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	79
Hình 3.12. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cDNA của gen chuyển <i>GmDREB6</i> từ mRNA của các cây chuyển gen thế hệ T0	79
Hình 3.13. Hình thái cây thuốc lá chuyển gen <i>GmDREB6</i> và cây không chuyển gen khi tưới H ₂ O và NaCl trong tủ cây sau 3 tuần ...	82
Hình 3.14. Mức độ biểu hiện của gen <i>GmDREB6</i> ở các dòng thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng <i>Actin</i> làm gen tham chiếu.....	83
Hình 3.15. Mức độ biểu hiện của các gen <i>NtP5CS</i> ở các dòng thuốc lá chuyển gen <i>GmDREB6</i> trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng <i>Actin</i> làm gen tham chiếu.....	84

Hình 3.16. Mức độ biểu hiện của các gen <i>NtCLC</i> ở các dòng thuốc lá chuyển gen <i>GmDREB6</i> trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng <i>Actin</i> làm gen tham chiếu.....	85
Hình 3.17. Hình ảnh quá trình biến nạp và tái sinh cây đậu tương chuyển gen.....	90
Hình 3.18. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại cấu trúc chứa gen <i>GmDREB6</i> trong hệ gen các cây đậu tương chuyển gen	92
Hình 3.19. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT- PCR khuếch đại cấu trúc chứa gen <i>GmDREB6</i> trong hệ gen các cây đậu tương chuyển gen	93
Phụ lục 1. Dữ liệu trình tự gen <i>GmDREB</i> và protein thuộc phân họ DREB của đậu tương sử dụng trong phân tích	123

DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABA	Abscisic Acid	Axit Abxixic
AS	Acetyl seringone	
bp	base pairs	Cặp bazơ nitơ
cs		Cộng sự
CCM	Cocultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
Ct	Threshold of Cycle	Chu kỳ ngưỡng
DAB	3,3 '-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	
DRE	Dehydration Responsive Element	Yếu tố điều hoà phản ứng với sự mất nước
DREB	Dehydration Responsive Element Binding	Yếu tố gắn với DRE
DPBB	Double Psi Beta-Barrel structure	Vùng cấu trúc DPBB
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Kỹ thuật ELISA sử dụng trong phân tích hàm lượng protein
EST	Expressed Sequence Tag	Trình tự đánh dấu biểu hiện
ETDA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	
EXP	Expansin	Protein expansin
<i>EXP1</i>	<i>Expansin 1</i>	Gen <i>expansin 1</i>
FAO	Food and Agriculture Organization	Tổ chức Nông - Lương thế giới
GFP	Green Fluorescence Protein	Protein phát xạ lưu huỳnh
GM	Germination Medium	Môi trường nảy mầm

<i>GmDREB</i>	<i>Glycine max DREB gene</i>	Gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB ở đậu tương
<i>GmEXPI</i>	<i>Glycine max expansin gene</i>	Gen mã hóa enzyme GmEXP1 ở đậu tương
GUS	P-Glucuronidase	
IPTG	IsoPropylThio - β - Galaccto side	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MCS	Multi Cloning Site	Vùng cắt gán đa vị
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường dinh dưỡng cơ bản trong nuôi cấy <i>in vitro</i>
<i>NtCLC</i>	<i>Nicotiana tabacum Chloride channel gene</i>	Gen CLC mã hoá protein là kênh vận chuyển ion Cl^- ở cây thuốc lá
<i>NtP5CS</i>	<i>Nicotiana tabacum Pyrroline-5-carboxylate synthetase gen</i>	Gen P5CS mã hoá enzyme tham gia tổng hợp proline ở
OD	Optical Density	Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
P5CR	l-A1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase	Enzyme tham gia chuỗi phản ứng tổng hợp proline
P5CS	l-A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase	Enzyme tham gia chuỗi phản ứng tổng hợp proline
RM	Rooting Medium	Môi trường tạo rễ
rpm	Revolution Per Minute	Số vòng/phút
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược
SEM	Shoot Elongation Medium	Môi trường kéo dài chồi
SIM	Shoot Induction Medium	Môi trường cảm ứng tạo đa
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào

Ti-plasmid	Tumor inducing - plasmid	Plasmid gây khối u
TMB	3,3',5,5'-TetraMethyl Benzidine	
UTR	UnTranslated Region	Vùng không dịch mã
WT	Wild Type	Cây không biến nạp, cây không chuyển gen
X-gal	5 -bromo-4-chloro-3 -indolyl-beta-D- galacto-pyranoside	

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 tác động của 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, lượng mưa không đều ở các thời điểm trong năm và giữa các vùng miền; 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 cũng như đối với nhiều quốc gia trên thế giới.

Đặc tính 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 chịu hạn. 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 tác động của hạn, mặn ở mức phiên mã, trong đó có protein DREB (Dehydration responsive element binding protein). DREB là một phân họ của 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, do đó cải thiện khả năng chịu hạn ở nhiều đối tượng thực vật. 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 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 *GmDREB6* 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 DT22 thông qua *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, mở ra triển vọng ứng dụng công nghệ gen vào thực tiễn chọn giống cây trồng. 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.

Các bài báo công bố trên các tạp chí khoa học – Công nghệ quốc gia và quốc tế là những tư liệu tham khảo có giá trị trong nghiên cứu, giảng dạy sinh học và công nghệ sinh học.

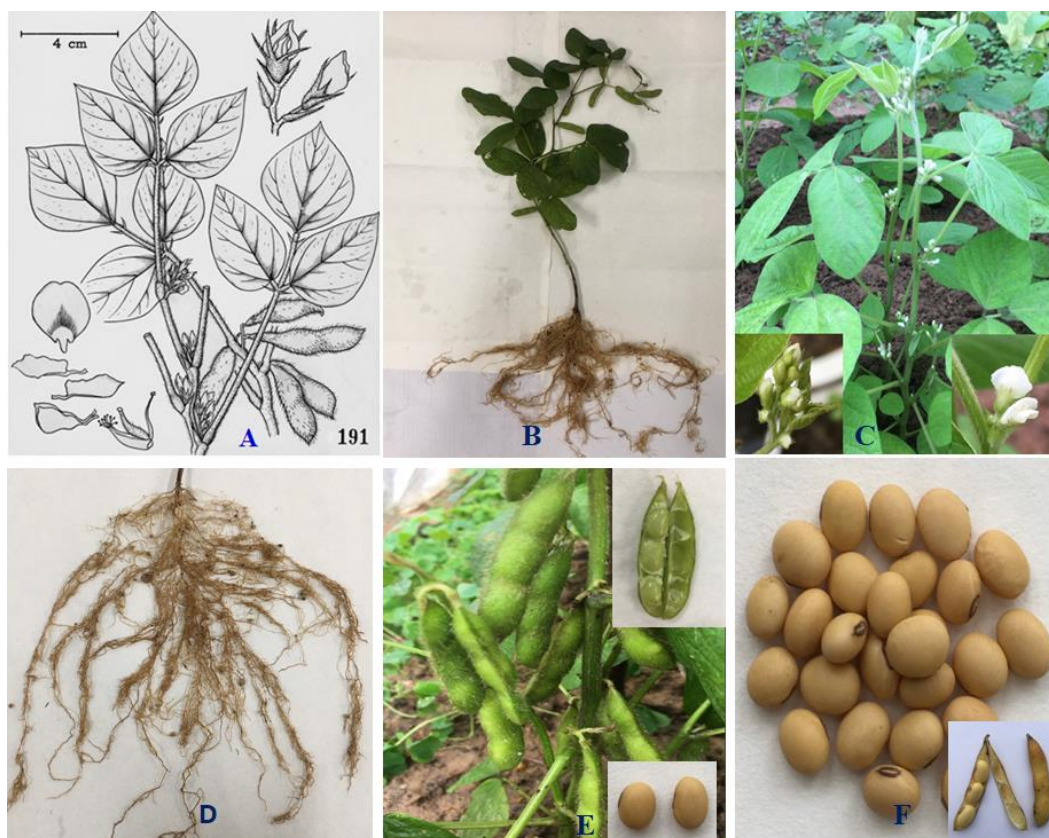
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN, CHỊU MẶN

1.1.1. Cây đậu tương

Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) thuộc họ đậu Fabaceae, chi *Glycine*, là một loại cây trồng được biết đến từ rất lâu. Các bằng chứng về lịch sử, địa lý và khảo cổ học chỉ ra rằng đậu tương có nguồn gốc từ Trung Quốc xuất hiện vào khoảng thế kỷ XVII trước công nguyên, sau đó loại cây này được ở nhiều nước Châu Á Châu Âu và Hoa Kỳ. Hệ thống phân loại đậu tương dựa vào đặc điểm về hình thái, phân bố địa lý và số lượng nhiễm sắc thể. Chi *Glycine* được chia ra thành 7 loài hoang dại lâu năm, và chi phụ *Soja* được chia ra làm 2 loài: loài đậu tương trồng *Glycine* (L.) Merr và loài hoang dại hàng năm *Glycine Soja* Sieb và Zucc [2].

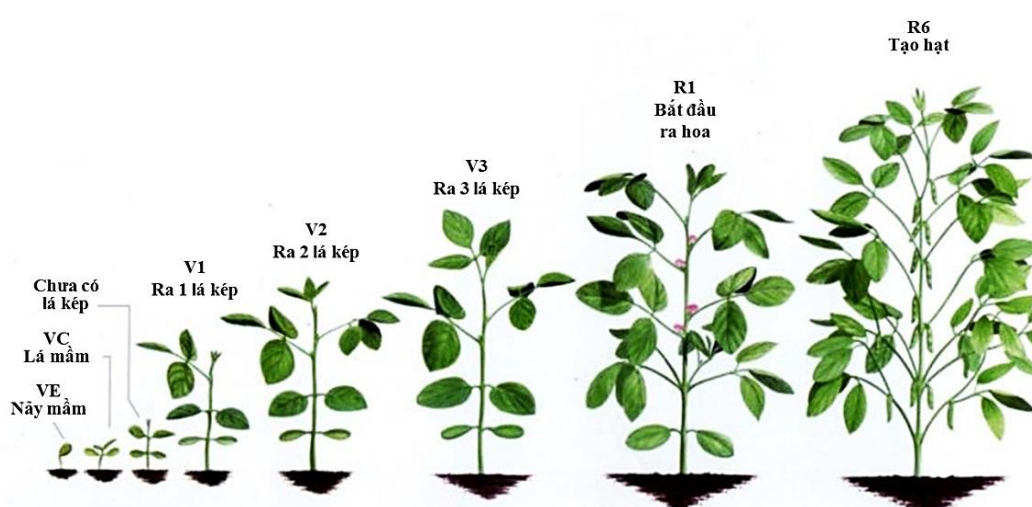
Về đặc điểm thực vật học, đậu tương là cây thân thảo, tự thụ phấn, cây trồng cạn thu hạt, gồm thân, rễ, lá, hoa, quả và hạt (Hình 1.1). Từ lúc nảy mầm đến khi cây có 5 lá thật (3 lá kép) khoảng 25-30 ngày sau khi gieo, thân sinh trưởng với tốc độ bình thường. Khi cây đã có 6-7 lá thật (4-5 lá kép) thân bắt đầu phát triển mạnh, tốc độ mạnh nhất vào lúc ra hoa rộ (Hình 1.2). Sự khác biệt của cây đậu tương với cây trồng khác là khi cây ra hoa rộ lại là lúc thân cành phát triển mạnh nhất. Đây là giai đoạn 2 quá trình sinh trưởng sinh dưỡng và sinh trưởng sinh thực cạnh tranh nhau dẫn đến khủng hoảng thiếu dinh dưỡng, cho nên cần phải cung cấp đầy đủ dinh dưỡng trước khi vào thời kỳ này và tạo điều kiện cho bộ rễ phát triển thuận lợi.



Hình 1.1. Một số đặc điểm hình thái cây đậu tương (*Glycine max*)

A: Hình vẽ mô tả hình thái cây đậu tương [149]; B: Mẫu ép đậu tương [150]; C: Hoa đậu tương; D: Nốt sần đậu tương; E: Cây đậu tương, quả và hạt; F: Hạt đậu tương [151]

Rễ đậu tương gồm có rễ cái và nhiều rễ con, rễ cái do phôi phát triển thành và có thể ăn sâu tới 150 cm, thông thường chỉ ăn sâu 20 – 30 cm. Từ rễ cái mọc ra nhiều rễ con. Trên rễ có rất nhiều nốt sần, đó là kết quả của sự cộng sinh giữa vi khuẩn *Rhizobium japonicum* với rễ. Nốt sần có thể dài 1 cm, đường kính 5 – 6 mm, khi mới hình thành nó có màu trắng sữa, khi phát triển tốt nhất nốt sần có màu đỏ hồng thì có khả năng cố định nitơ mạnh, nếu nốt sần cắt ngang có màu đen là không còn khả năng cố định nitơ [2].



Hình 1.2. Các giai đoạn sinh trưởng của cây đậu tương [151]

Thân cây đậu tương có nhiều lông nhỏ và nhiều đốt, lá mọc từ các đốt, cành mọc từ nách lá. Thân cây có màu xanh, xanh nhạt, tím nhạt. Chiều cao thân dao động từ 20 – 50 cm, có thể lên tới 150 cm và được chia làm nhiều loại như thân đứng, bán đứng, leo. Dựa vào sự sinh trưởng của thân chia thành các loại là sinh trưởng hữu hạn (thân ngừng phát triển khi quả chín), sinh trưởng bán hữu hạn (quả sắp chín thân vẫn tiếp tục dài ra) và loại hình trung gian [2].

Lá đậu tương có 3 loại: lá mầm, lá đơn và lá kép có 3 lá chét. Lá có thể có hình quả xoan, ngọn giáo, trứng. Màu xanh của lá có ảnh hưởng đến sản lượng quả, lá nằm cạnh hoa nào thì có quyết định đến chính chùm hoa, quả đó. Độ góc sắp xếp lá trên cây có ý nghĩa quan trọng, độ góc hẹp lá sắp xếp thẳng góc với tia sáng thì có khả năng tận dụng được nhiều năng lượng mặt trời và có thể trồng dày để thu năng suất cao [2].

Cành trên thân thay đổi tùy theo giống, thời vụ và điều kiện canh tác. Cành mọc từ đốt thứ nhất tới đốt thứ 12, mọc khỏe từ đốt thứ 5 - 6. Giống chín sớm vụ xuân có thể không có cành hoặc chỉ có từ 1 - 2 cành, các giống chín muộn vụ hè có từ 4 - 6 cành. Trong chọn tạo giống mục tiêu chọn ra các

giống có số cành cấp 1 trên cây nhiều để tăng năng suất. Một số vùng trồng đậu tương áp dụng biện pháp ngắt ngọn khi cây có 4- 5 lá để tăng khả năng phân cành [2].

Hoa đậu tương được phát sinh từ nách lá, đầu cành hoặc đầu thân, hoa có màu tím, tím nhạt, trắng. Hoa đậu tương rất bé, có chiều dài 6 -7mm và mọc thành chùm. Hoa có cấu tạo dạng cánh bướm đặc trưng với ống dài 5 cánh không bằng nhau và tràng hoa bao gồm cánh cờ phía sau, 2 cánh bên và 2 cánh phía trước tiếp xúc nhau. Bộ nhị hoa gồm 10 nhị chia thành 2 nhóm, nhóm 1 gồm 9 nhị với cuống dính với nhau thành một khối và nhóm 2 nhị chỉ có 1 nhụy hoa, nhụy hoa có 1 lá noãn và từ 1 đến 4 lá noãn dính. Hoa ra nhiều nhưng tỷ lệ rụng rất cao khoảng 30% có khi lên tới 80% [2].

Quả đậu tương thuộc loại quả giáp, số quả trên cây tùy thuộc vào giống và điều kiện ngoại cảnh, số quả trên cây dao động từ 10 - 20 quả với các giống chín sớm, các giống chín trung bình và chín muộn thì số quả trên cây nhiều hơn, có thể lên tới 150 quả/cây. Mỗi quả có từ 1 - 4 hạt nhưng chủ yếu là 2 - 3 hạt. Hạt thường có dạng hình tròn, dẹt, bầu dục. Màu sắc hạt có thể là vàng, vàng rom, xanh, hoặc màu đen như một số giống nhập nội. Giống có hạt màu vàng giá trị thương phẩm cao. Trong hạt, phôi thường chiếm 2%, 2 lá tử diệp chiếm 90% và vỏ hạt 8% tổng khối lượng hạt. Các giống có rón hạt màu trắng được ưa chuộng hơn các giống có rón hạt màu đen, nâu. Khối lượng 1000 hạt thay đổi tùy theo giống và điều kiện canh tác, có thể dao động từ 50 - 400g [2]. Khi các hạt đã rần dầm và đạt đến độ chín sinh lý vỏ hạt có màu sắc đặc trưng của giống, còn vỏ quả thì chuyển sang màu vàng, vàng tro, xám, lá cây cũng chuyển sang úa vàng và rụng dần. Hàm lượng dầu trong hạt được ổn định sớm lúc hạt đang phát triển nhưng hàm lượng protein thì vẫn còn chịu ảnh hưởng của điều kiện dinh dưỡng của cây cho đến cuối thời kỳ của quá trình chín [2].

Các nhân tố sinh thái cũng ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương. Đất trồng thích hợp nhất là đất thịt nhẹ, tơi xốp, sẫm màu, thoáng, thoát nước, pH từ 6,5- 7,2. Thời kỳ mọc nhiệt độ thích hợp nhất là 18- 22 °C, phạm vi nhiệt độ tối thiểu và tối đa cho thời kỳ mọc là 10 °C và 40 °C. Nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng cành lá là 20- 23 °C, thấp nhất là 15 °C, cao nhất là 37°C. Nhiệt độ dưới 10 °C ngăn cản sự phân hoá hoa, dưới 18°C đã có khả năng làm cho quả không đậu. Nhiệt độ thích hợp nhất cho thời kỳ ra hoa là 22- 25 °C. Nhiệt độ thích hợp nhất cho thời kỳ hình thành quả và hạt là 21- 23 °C, thấp nhất là 15 °C cao nhất là 35 °C. Thời kỳ chín nhiệt độ thích hợp nhất là 19- 20 °C. Nhiệt độ 25- 27 °C hoạt động của vi khuẩn nốt sần tốt nhất.

1.1.2. Đặc tính chống chịu hạn, mặn của cây đậu tương

Các tác động bất lợi từ ngoại cảnh hay những stress có thể là nhân tố sinh học hoặc phi sinh học. Các stress phi sinh học thường xuyên tác động đến thực vật nói chung, cây đậu tương nói riêng. Những yếu tố môi trường gây ra stress là úng nước, hạn, nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp, đất mặn, thiếu chất dinh dưỡng trong đất; ánh sáng, gió, kim loại nặng và tổn thương cơ học. Sự chống chịu hoặc mẫn cảm đối với stress phụ thuộc vào đặc tính của loài, kiểu gen, các giai đoạn phát triển của thực vật. Những phản ứng của thực vật đối với các tác động của các stress thể hiện ở sự thay đổi biểu hiện gen, trao đổi chất trong tế bào cho đến những thay đổi tỉ lệ sinh trưởng và năng suất. Thời gian, mức độ khốc liệt của stress ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của cây trồng.

Tính chống chịu là khả năng của thực vật ngăn ngừa, kháng lại và chịu đựng được các tác động bất lợi từ ngoại cảnh. Có ba dạng chống chịu các

stress phi sinh học, đó là khả năng tránh stress (stress avoidance), khả năng kháng stress (stress tolerance) và khả năng chịu đựng được các stress.

1.1.2.1. Tác động của hạn và cơ chế phân tử của tính chịu hạn

Hạn là hiện tượng thường xuyên xảy ra trong tự nhiên và liên quan trực tiếp đến vấn đề nước trong cơ thể thực vật. Hạn cũng như những yếu tố ngoại cảnh khác khi tác động lên cơ thể, gây ra các phản ứng của cơ thể, tùy theo từng loài, giống mà mức độ phản ứng của cơ thể cũng như thiệt hại khô hạn gây ra khác nhau: một số bị chết, một số bị tổn thương, một số khác bị ảnh hưởng, còn số khác có thể không bị ảnh hưởng...

Hiện tượng khô xảy ra khi mất một phần nước trong các cơ quan ở giai đoạn nhất định của chu kỳ sống ở thực vật (hạt, bào tử). Hiện tượng này không làm ảnh hưởng đến tế bào, mô của cây. Đây là quá trình biến đổi trạng thái trong tế bào có sự điều khiển của hệ thống thông tin di truyền. Trong giai đoạn hình thành hạt, tế bào bị mất nước, khả năng chịu hạn tăng lên. Khả năng này đạt cực đại ở thời kỳ hạt chín và có chiều hướng giảm dần khi hạt nảy mầm. Hạt khô còn có khả năng chống chịu với hàng loạt các điều kiện ngoại cảnh bất lợi khác như nhiệt độ, gió [9].

Hạn do tác động của môi trường gây ảnh hưởng đến đời sống của cây, có thể dẫn đến hủy hoại cây cối và mất mùa. Hiện tượng này xảy ra khi trong môi trường đất và không khí thiếu nước đến mức áp suất thẩm thấu của cây không cạnh tranh được để lấy nước vào tế bào. Những yếu tố bất lợi này chính là các thành phần như thổ nhưỡng, nhiệt độ, gió nóng hay thời tiết và khí hậu.

Có thể phân biệt hai loại hạn do môi trường tác động, đó là hạn đất và hạn không khí. Hạn đất thường xảy ra những vùng có khí hậu hay thổ nhưỡng đặc thù, hạn đất tác động mạnh lên bộ rễ của cây. Sự tác động này được biểu

hiện qua sự điều tiết các hormon giúp cho cây chống chịu được điều kiện cực đoan [11]. Hạn không khí, nhiệt độ thường xảy ra ở những vùng gió, nhiệt độ cao. Hạn không khí thường tác động chủ yếu lên các bộ phận bên trên mặt đất như lá, hoa... Hạn do tác động của môi trường dẫn đến hiện tượng mất nước trong cây ở các bộ phận mô, tế bào khác nhau [9].

Hạn tác động lên cây theo hai hướng chính: làm tăng nhiệt độ cây và gây mất nước trong cây. Nước là yếu tố giới hạn đối với cây trồng, vừa là sản phẩm khởi đầu vừa là sản phẩm trung gian và cuối cùng các quá trình chuyển hóa sinh học. Nước là môi trường để các phản ứng trao đổi chất xảy ra, do vậy việc cung cấp nước cho cây trồng là mục tiêu tạo giống chống chịu thường xuyên được quan tâm. Mức độ thiếu hụt nước càng lớn thì càng ảnh hưởng xấu đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Nếu thiếu nước nhẹ sẽ làm giảm tốc độ sinh trưởng, thiếu nước trầm trọng sẽ làm biến đổi hệ keo nguyên sinh chất làm tăng cường quá trình già hóa tế bào khi bị khô kiệt nước, nguyên sinh chất bị đứt vỡ cơ học dẫn đến tế bào, mô bị tổn thương và chết. Đối với thực vật nói chung và cây trồng nói riêng, hạn ảnh hưởng mạnh và gây hậu quả nghiêm trọng đến hai giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây, đó là giai đoạn cây non và giai đoạn ra hoa [9]. Như vậy, ảnh hưởng cực đoan của hạn ở bất cứ giai đoạn sinh trưởng nào của cây trồng cũng tác động đến các yếu tố cấu thành năng suất, làm giảm năng suất của cây trồng.

Stress phi sinh học là nguyên nhân chính dẫn đến mất mùa trên toàn thế giới, gây ra thiệt hại đến năng suất bình quân hơn 50% ở nhiều loại cây trồng. Trong số các stress phi sinh học, hạn là yếu tố chính làm giảm năng suất cây trồng. Stress hạn phá vỡ sự cân bằng nội môi và phân bố ion trong tế bào [147]. Cây trồng phản ứng với các stress hạn thông qua các con đường truyền tin và phản ứng tế bào như tổng hợp các protein stress, tăng cường các chất chống oxy hóa, tích lũy các chất tan [37]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy,

hạn gây ra những tác động tiêu cực ở tất cả các cấp độ và các giai đoạn phát triển của thực vật. Trong các loại hạn tác động đến thực vật, hạn sinh lý gây mất nước do độ mặn của đất là rất nghiêm trọng. Để kháng lại các stress hạn sinh lý, trong cơ thể thực vật diễn ra chuỗi các quá trình hóa sinh, với sự tham gia của rất nhiều yếu tố. Trong điều kiện hạn, các phản ứng sinh hóa khác nhau được kích hoạt trong cây, tích lũy nhiều loại chất dễ hòa tan, như đường, amino acid, glycine betaine và polyamine. Các chất tan trong tế bào làm tăng áp suất thẩm thấu này để giúp các cây trồng đối phó với hạn [50], tăng hàm lượng các chất chống oxy hóa, chẳng hạn như glutathione S-transferase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase và catalase [19].

Gần đây, những hiểu biết về biểu hiện gen, cơ chế phiên mã và cơ chế truyền tín hiệu phản ứng với stress hạn của cây trồng đã được công bố. Những phân tích sinh học phân tử và di truyền học đã tạo nền tảng cho những khám phá chức năng gen và ứng dụng trong kỹ thuật di truyền với việc sử dụng một số gen chức năng hoặc một số gen điều hòa liên quan đến tính chịu hạn, chịu mặn của cây trồng [124]. Vì vậy, cơ sở phân tử của đặc tính chịu hạn ở thực vật nói chung và cây đậu tương nói riêng cũng dần được sáng tỏ. Các gen phản ứng với stress hạn có thể chia thành 2 nhóm chính: Nhóm gen chức năng mà sản phẩm của chúng tham gia trực tiếp vào các phản ứng stress hạn như gen điều hòa áp suất thẩm thấu, gen mã hóa các protein chống oxy hóa, gen mã hóa protein LEA (Late embryogenesis abundant), gen mã hóa protein vận chuyển LTP (Lipid transfer protein), aquaporin; nhóm gen điều khiển cho ra các sản phẩm bao gồm các nhân tố phiên mã và các protein kinase truyền tín hiệu. Các nhân tố phiên mã liên quan đến khả năng chịu hạn đang được quan tâm nghiên cứu bao gồm DREB, WRKY, bZIP, MYB, NCED và AP2ERF. Các protein kinase truyền tín hiệu bao gồm: Protein kinase phụ thuộc cao, MAPK (Mitogen activated protein kinase), RPK (Receptor-like protein

kinase), PIK (Phosphatidyl inositol kinase) và protein kinase serine/threonine [78].

Sự biểu hiện của các gen cảm ứng với hạn liên quan chặt chẽ với quá trình phiên mã. Sự biểu hiện của các gen này chịu ảnh hưởng rất nhiều của môi trường trong và ngoài cơ thể và ở nhiều mức độ điều hòa. Các nhân tố phiên mã (Transcription factors - TF) đóng vai trò điều khiển quan trọng của những thay đổi trong biểu hiện gen và phản ứng với các stress môi trường. Có thể thấy rõ ở thực vật, các gen mã hóa nhân tố phiên mã chiếm phần lớn trong hệ gen. Ví dụ, cây *Arabidopsis* có đến 1500 TF trong hệ gen [108]. Nhân tố phiên mã có thể kích thích hoặc ức chế quá trình phiên mã của gen chức năng. Các nhân tố này đã được sử dụng để làm tăng cường khả năng chịu hạn cho cây trồng và hầu hết các gen này đã được xác định và phân tích ở cây *Arabidopsis* [29]. Hiện nay, protein DREB (một trong bốn phân họ lớn của họ AP2/ERF) là nhóm TF được nghiên cứu và thu được các kết quả khả quan trong điều kiện stress phi sinh học, bởi vì nó kích hoạt sự biểu hiện của nhiều gen mục tiêu chịu trách nhiệm kiểm soát các yếu tố liên quan [55]. Trong cây *Arabidopsis*, nhân tố phiên mã DREB tác động đến 474 gen mục tiêu. Trong số những gen này, 160 gen có đáp ứng với stress phi sinh học và 27 gen cảm ứng với tình trạng thiếu nước [80]. Như vậy nhân tố phiên mã trong phân họ DREB là đối tượng hấp dẫn cho nghiên cứu đặc tính chịu hạn và xây dựng biện pháp cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương.

1.1.2.2. Tác động của mặn và cơ chế chịu mặn ở cây đậu tương

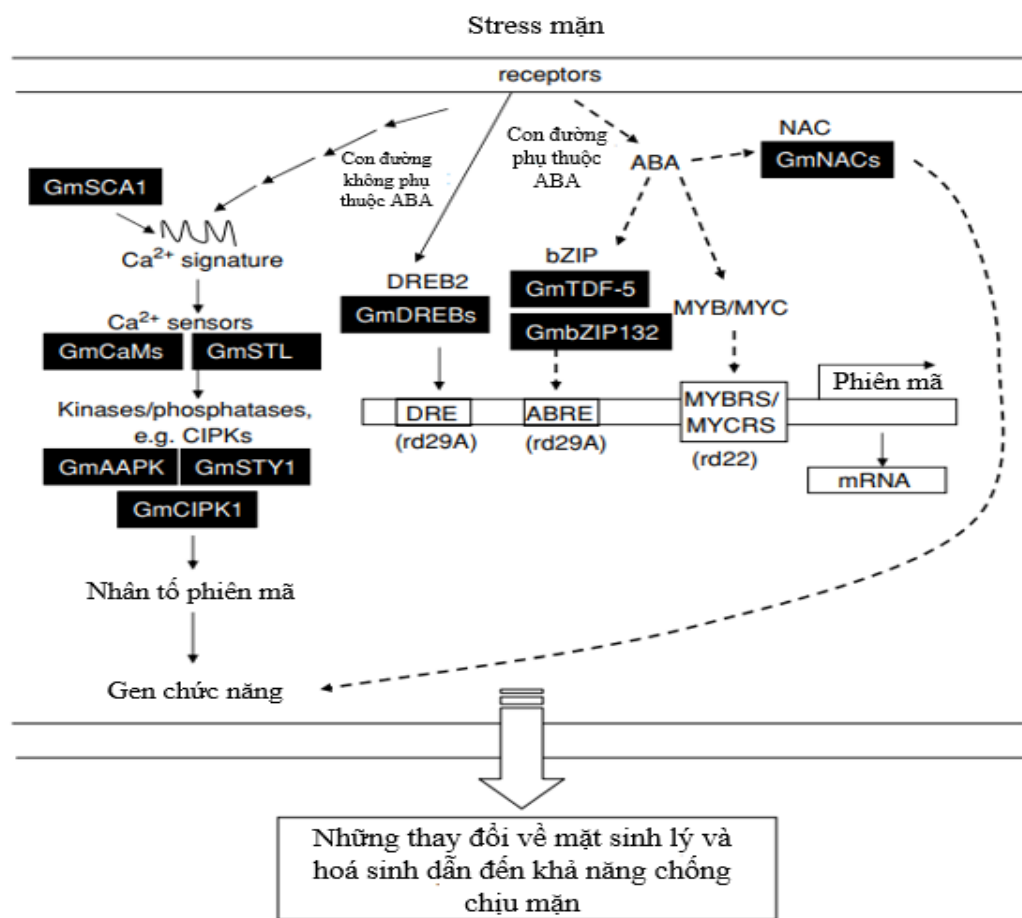
Nồng độ chất hoà tan trong dung dịch càng cao thì khả năng thẩm thấu của nước càng nhỏ. Nếu không chứa muối thì nước dễ thấm qua màng bán thấm để đi vào tế bào chất, tuy nhiên, mức độ thấm còn phụ thuộc áp suất nội bào, tức là sức căng của tế bào. Đất không nhiễm mặn có tiềm năng thẩm thấu

thấp, ngược lại đất nhiễm mặn có tiềm năng thẩm thấu cao. Thực vật sống trên đất nhiễm mặn chịu hai tác động sinh lý, đó là hiện tượng hạn sinh lý, nước sẽ thẩm thấu từ tế bào ra ngoài môi trường; và tác dụng gây độc tế bào của các ion trong đất nhiễm mặn [38].

Hàm lượng muối cao có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của cây trồng vì chúng làm thay đổi hệ vi sinh hoạt động trong đất và chúng trực tiếp làm suy giảm sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Muối NaCl tác động đến thực vật ở hai phương diện, thẩm thấu và ionic gây hại trao đổi chất. Về phương diện thẩm thấu, NaCl làm tăng áp suất thẩm thấu ở môi trường ngoài, nên cản trở sự hút nước của cây; đồng thời làm mất nước của tế bào rễ cây và tế bào khí khổng gây đóng khí khổng. Về mặt gây hại cho trao đổi chất, Na^+ cạnh tranh K^+ ở vị trí liên kết với các enzyme, trong khi K^+ kích hoạt hơn 50 enzyme trong tế bào, điều mà ionic Na^+ không có chức năng này. Bên cạnh đó, khi Na^+ vào tế bào lại đòi hỏi tổng nhiều chất tan tương thích ở chất nguyên sinh tiêu tốn nhiều ATP và gây hại quá trình trao đổi chất. Sự cân bằng nội môi của các ion rất quan trọng bởi vì nồng độ ion rất cao hoặc rất thấp có thể ức chế hoạt động của enzyme trong tế bào. Hầu hết các enzyme có thể bị ức chế bởi nồng độ Na^+ bắt đầu ở 100 mM. Các lá già đi cùng với sự giảm hàm lượng diệp lục và khả năng quang hợp [84]. Khi bị nhiễm mặn thực vật hạn chế khả năng thẩm thấu nước của màng tế bào [108]. Sự tích lũy và duy trì nồng độ cao các chất tan trong tế bào làm tăng áp suất thẩm thấu chống lại hiện tượng hạn sinh lý [91].

Cây trồng có thể tránh được những tác động tiêu cực của điều kiện mặn là hạn chế sự xâm nhập của các ion. Ví dụ như cam quýt và nho có thể giữ

Na^+ trong rễ và thân cây, không tích trữ ở chồi. Những nghiên cứu về tác động của NaCl lên sinh trưởng và phát triển của cây trồng như lúa mạch, dòng tế bào cam nuôi cấy *in vitro*, và trao đổi ion ở lúa... cho thấy thực vật có khả năng thích ứng trong một giới hạn nhất định với tác động của muối trong môi trường đất và nước. Tuy nhiên, mức độ chống chịu mặn còn phụ thuộc vào kiểu gen của thực vật (Hình 1.3).



Hình 1.3. Sơ đồ con đường dẫn truyền tín hiệu trong tế bào khi bị stress mặn ở thực vật bậc cao. ABA: abscisic acid; bZIP: basic leucine-zipper; DRE và ABRE: yếu tố đáp ứng với hạn hán và yếu tố đáp ứng với ABA trong promoter rd29A; CIPK: protein kinases giống SOS2; GmAAPK, GmbZIP132, GmCaMs, GmNACs, GmSCA1, GmSTL, GmSTY1, GmTDF-

5,: protein tham gia chịu mặn ở đậu tương; MYBRS: Vị trí nhận biết MYB trong promoter rd22; MYCRS: Vị trí nhận biết MYC trong promoter rd22; MYB, MYC, NAC, (NAM, ATAF1, ATAF2, CUC2): Các nhân tố phiên mã. Các thành phần trong ô đen đã được xác định trong đậu tương. Các đường chấm cho biết con đường phụ thuộc ABA. Các đường liền nét chỉ ra con đường không phụ thuộc ABA [102].

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. Các cơ chế 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 enzyme 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 [22].

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 [127]. 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 [148]. 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 [71]. Ở lúa, xử lý bằng NaCl làm tăng quá trình phiên mã của gen *CLC-1*, điều này cho thấy gen *CLC-1* đã tham gia vào quá trình vận chuyển Cl^- [36], [86].

Thực vật sống trong điều kiện stress mặn biểu hiện các triệu chứng hoặc phản ứng sinh lý phổ biến do sự tích tụ mức độ độc hại của các ion (Na^+ , Cl^- và SO_4^{2-}) trong tế bào của chúng, dẫn đến mất cân bằng dinh dưỡng và

thẩm thấu và mất nước [106], [122]. Hơn nữa, các loại phản ứng oxy hóa (ROS) đã tạo ra các gốc tự do, chẳng hạn như anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$), gốc hydroxyl ($OH^{\cdot}$) và hydrogen peroxide (H_2O_2) tích tụ trong các cây bị stress do muối [18], [58]. Hiện tượng này có thể dẫn đến thành tế bào thực vật có thể bị phá vỡ, làm cho tế bào thực vật chết [106], [122]. Sự tích tụ các ion Na^+ và Cl^- trong dung dịch đất dẫn đến gây độc tế bào và tại đó các ion này gây trở ngại cho các nguyên tố thiết yếu khác, chẳng hạn như canxi và kali [54].

Ở các loài thực vật sống thường xuyên trên đất nhiễm mặn có khả năng thu nhận và tích tụ Na^+ và Cl^- cao hơn nhiều so với thực vật có khả năng chịu mặn kém [39]. Đây là cơ chế chính tạo nên tính chịu mặn của thực vật sống trên đất nhiễm [47]. Sự tích lũy betain và glycinebetain có tác dụng làm gia tăng tính chịu mặn [50]. Khi bị xử lý bằng muối hoặc KCl, tế bào thực vật đã xuất hiện các protein lạ và các protein nhóm này cũng đã được tìm thấy trong tế bào thuốc lá nuôi cấy *in vitro*, cà chua, đậu xanh và cây đinh lăng sau khi xử lý muối. Hoạt động của một số enzyme như polyphenol oxydase và catalase tăng lên ở hạt lúa nảy mầm trong điều kiện mặn. Mối liên quan giữa ABA, tính chịu muối và sự tổng hợp các protein đặc biệt là điểm mấu chốt khởi đầu cho những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chịu mặn của thực vật, bởi vì các loại protein này có mối liên hệ giữa stress của môi trường bên ngoài với những đặc điểm sinh lý và phân tử bên trong tế bào thực vật [125].

Claes và cs sử dụng phương pháp điện di hai chiều đã tìm thấy 8 protein mới ở rễ của giống lúa Tai chung native khi bị xử lý muối và xác định được một chuỗi protein có khối lượng phân tử là 15 kDa, điểm đẳng điện là 5,5 [32]. Nhiều công trình đã nhận xét rằng hàm lượng proline đã tăng trong các dòng tế bào chịu NaCl [55]. Vai trò của proline đối với khả năng chịu mặn của thực vật được thể hiện ở hiện tượng tăng sự tích lũy khi cây gặp mặn. Việc bổ sung proline ngoại sinh và glycine betain vào môi trường nuôi cấy

phôi cây *Hordeum ougare* đã làm tăng kích thước chồi khi xử lý bằng NaCl. Các đột biến làm tăng tổng hợp proline nhiều hơn bình thường thì thực vật có khả năng chịu mặn tốt hơn. Vấn đề hiện nay là nguyên nhân và hiệu quả của sự tổng hợp proline trong phản ứng đối với NaCl là vẫn chưa được biết cặn kẽ. Việc cây giữ lại NaCl trong không bào và proline trong tế bào chất có thể là để tăng khả năng chống chịu mặn [55]. Quá trình thẩm thấu chủ yếu được đáp ứng với sự tích tụ các chất hòa tan trong điều kiện hạn và mặn làm tăng khả năng giữ nước của tế bào [117]. Đường hòa tan, proline, glycine betaine, axit hữu cơ và đường trehalose là một số chất thẩm thấu chính. Báo cáo của Kaya và cs cho rằng sự tích lũy proline đã tăng lên ở cây ngô bị stress mặn [61]. Hơn nữa, các gen mã hóa các enzyme tổng hợp proline, arginine và một số gen khác có thể có vai trò quan trọng trong khả năng chịu mặn ở loài cà chua dại (*Solanum chilense*) [59].

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 biểu hiện quá mức của P5CS ở đậu tương làm tăng hàm lượng proline trong cây chuyển gen, dẫn đến một dòng chuyển gen có khả năng chịu mặn cao [55]. 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 [143]. Như vậy, P5CR và P5CS là hai enzyme xúc tác cho phản ứng cuối cùng để sản sinh ra proline. Tăng cường biểu hiện gen mã hóa hai loại enzyme P5CR và P5CS sẽ làm tăng hoạt tính enzyme và làm tăng khả năng chịu mặn của thực vật [145].

Các gen *CLC* thực vật đầu tiên được nhân bản trên cây thuốc lá [77], [50] và cho đến nay, hầu hết thông tin về gen *CLC* và protein của nó trong hệ thống thực vật đã được thông báo [148]. Ở đậu tương, Li và cs báo cáo rằng gen *GmCLC* tương đồng 78% với *AtCLC-a* ở cây *Arabidopsis*. Protein CLC

được phát hiện khi cây nhận được tín hiệu từ stress NaCl và stress hạn. Sự hiện diện của CLC làm tăng sự vận chuyển ion Cl^- từ tế bào chất vào không bào và có khả năng chống lại NaCl cho tế bào BY-2 của thuốc lá [71].

Rễ cây đậu tương chịu mặn đóng một vai trò tích cực chính trong việc loại trừ ion và khả năng chịu hạn sinh lý. Nghiên cứu về đậu tương đã gợi ý một số gen mà sự biểu hiện của chúng được gây ra hoặc bị ức chế trong các dòng chịu mặn trong điều kiện mặn và do đó có thể tham gia vào phản ứng của cây và thích ứng với stress do muối như *GmNHX1*, *GmCLC1*, *GmCAX1*, *GmPAP3*, *CDPK*,...[49], [102]. Việc xác nhận các nghiên cứu biểu hiện gen này là cần thiết cùng với mô tả đặc điểm vai trò của gen đối với stress muối thông qua các nghiên cứu biểu hiện quá mức và loại trực tiếp về các cây mẫu trước khi thông tin này có thể được sử dụng trong việc lai tạo các dòng đậu tương chịu mặn.

1.2. NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB Ở THỰC VẬT VÀ CÂY ĐẬU TƯƠNG

1.2.1. Đặc điểm của phân họ DREB ở thực vật và cây đậu tương

Các nhân tố phiên mã (transcription factor-TF) có thể được phân chia thành nhiều loại khác nhau dựa trên cấu trúc vùng liên kết của chúng với sợi DNA. Các TF là nhân tố có tác động *trans* liên kết với trình tự *cis* đảm nhận vai trò trung tâm hoạt hóa promoter trong biểu hiện của các gen mục tiêu. Các công trình nghiên cứu về DREB đều khẳng định rằng, protein DREB là nhân tố phiên mã tham gia tích cực vào quá trình chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường bằng cách kích hoạt hoạt động của các gen tham gia trực tiếp chống lại các điều kiện bất lợi như hạn, mặn và lạnh mà không cần thông qua sự tác động của ABA [8], [15], [9].

Các protein DREB được tìm thấy trong tế bào thực vật, đặc biệt khi thực vật gặp các điều kiện ngoại cảnh bất lợi như hạn, mặn và lạnh. DREB thuộc họ AP2/ERF, đây là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã ở thực vật, bao gồm bốn phân họ lớn: AP2 (APETALA 2), RAV (Related to ABI3/VP1), ERF (Ethylene-responsive element binding factor) và DREB [41]. Protein DREB chứa miền AP2 có trình tự bám đặc hiệu với yếu tố *cis*: DRE, A/GCCGAC. Miền AP2 có khoảng 59- 60 amino acid. Các amino acid của DNA binding thuộc miền AP2 của DREB1 và DREB2 liên kết đặc hiệu với DRY, cho nên nhóm nhân tố DREB1 điều khiển tính chịu hạn, mặn và lạnh, trong khi nhóm DREB2 điều khiển tính chịu hạn, mặn [74]. Vì vậy, việc nghiên cứu về DREB đang được các nhà khoa học quan tâm bởi chúng không trực tiếp tham gia vào quá trình chống chịu hạn, mặn nhưng kích hoạt đồng thời sự biểu hiện của nhiều gen có chức năng chống chịu các stress phi sinh học. Nghiên cứu DREB sẽ giúp cải thiện khả năng chống chịu của thực vật đối với hạn và mặn thông qua chuyển gen.

Protein thuộc họ AP2/ERF cũng được tìm thấy ở cả những thực vật bậc thấp như tảo xanh (*Chlamydomonas reinhardtii*) [45], tương đồng với các miền AP2/ERF ở vi khuẩn. Do đó, có giả thuyết cho rằng các miền AP2/ERF được chuyển từ một loài vi khuẩn *Canobacterium* cộng sinh hoặc từ một loại vi khuẩn hay virus bởi hiện tượng biến nạp gen. Ở đầu N và ở đầu C của vùng AP2/ERF có chứa một đoạn xoắn β có chức năng nhận biết điểm bám trên promoter [80].

Từ những năm 80 của thế kỷ XX, các nhà khoa học trên thế giới đã quan tâm nghiên cứu về DREB, giải trình tự nucleotide của gen *DREB* trên các loài họ cúc (*Asteraceae*), hướng dương (*Helianthus annuus*), lúa mì (*Triticum aestivum* L.)... và kết quả trình tự gen *DREB* giữa các loài cây trồng và hoang dại đã tìm thấy sự sai khác giữa chúng. Từ đó, phương án cải thiện

khả năng chống chịu điều kiện môi trường sống bất lợi thông qua việc cải tiến ở mức phân tử đã được đề xuất, đó là chuyển gen mục tiêu từ loài chống chịu tốt vào loài chống chịu kém, hoặc biểu hiện quá mức gen mã hóa protein liên quan đến tính chống chịu của chính loài đó. Những gen này bao gồm cả các gen chức năng mã hóa các protein liên quan đến những chất chuyển hóa quan trọng đối với khả năng chịu hạn, chịu mặn hoặc mã hóa các nhân tố phiên mã. Đối với cây đậu tương, hướng nghiên cứu này bước đầu đã đạt được những thành công nhất định.

Dubouzet và cs (2003) nghiên cứu chức năng gen *DREB* trên lúa cho rằng gen *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D*, *OsDREB2A* được biểu hiện khi mất nước và nồng độ muối cao. Các *OsDREB1A* và *OsDREB2A* tạo protein liên quan đến yếu tố DRE và kích hoạt phiên mã của gen *GUS* tham gia vào quá trình chống chịu hạn [39]. Yang và cs (2007) đã phân lập được phân họ DREB trên đối tượng hoa cúc, theo đó phân họ gồm *DmDREBa* và *DmDREBb*, những gen này mã hoá cho hai protein có 191 amino acid và 185 amino acid với dự đoán trọng lượng phân tử là 21,66 và 20,99 kDa, các protein của 2 gen này được biểu hiện khi cây hoa cúc bị hạn, lạnh [140].

Nhiều thành viên phân họ DREB phản ứng với điều kiện bất lợi đã được phân lập và mô tả. Những nghiên cứu đã khẳng định các gen trong phân họ DREB là những thành tố quan trọng, liên quan đến sự phản ứng với nhân tố bất lợi phi sinh học ở thực vật bằng cách điều khiển biểu hiện gen thông qua các trình tự DRE/CRT [146]. Cho đến nay, nhiều nhân tố phiên mã thuộc phân họ DREB từ các loài thực vật khác nhau đã được chứng minh có liên quan đến phản ứng của stress phi sinh học. Cụ thể, protein DREB1 và DREB2 đóng vai trò quan trọng trong việc chống chịu stress bằng cách kích hoạt gen chức năng phiên mã thông qua liên kết với các trình tự DRE/CRT để hoạt hóa

promoter của chúng [79]. Đây chính là cơ sở cho việc nghiên cứu tăng cường khả năng chịu hạn của cây đậu tương bằng kỹ thuật biểu hiện mạnh gen *GmDREB*.

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 [102]. Ở Việt Nam, vấn đề nghiên cứu về *DREB* ở cây trồng nói chung và cây đậu tương nói riêng vẫn còn rất mới mẻ, có một vài công trình công bố về gen *DREB* thuộc nhóm nghiên cứu của Chu Hoàng Mậu và cs từ năm 2010 đến nay. Đó là nghiên cứu đặc điểm cấu trúc gen *DREB1* (2010), *DREB5* (2011), *DREB2* (2015), *DREB6* (2019)... [10], [9], [55]. Chính vì vậy, việc nghiên cứu gen *DREB* sẽ tạo cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng và chuyển gen *DREB* ở cây đậu tương.

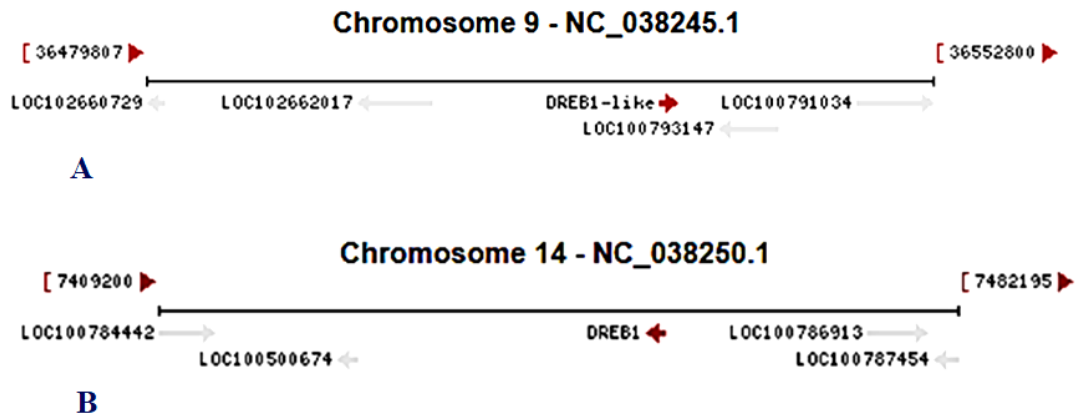
Trong số các gen *GmDREB* trong hệ gen của cây đậu tương, một số gen đã được làm rõ chức năng, như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5*. Trong đó, *GmDREB1* có chức năng chịu nóng, hạn và lạnh [8]. *GmDREB2* được xác nhận làm tăng khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây chuyển gen [33], [130]. *GmDREB3* làm tăng cường khả năng chịu lạnh, hạn và mặn ở cây *Arabidopsis* biến đổi gen [30]. *GmDREB5* liên quan đến khả năng chịu mặn [105]. 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.

Phân họ DREB thuộc họ AP2/ ERF được phân loại thành 6 phân nhóm, A - 1 đến A - 6 [108]. DREB1A và DREB2A lần lượt là thành viên của phân nhóm A - 1 và A - 2. Hệ gen của *Arabidopsis* bao gồm sáu gen trong phân nhóm A - 1: *DREB1A/ CBF3*, *DREB1B/ CBF1*, *DREB1C/ CBF2*, *DREB1D/ CBF4*, *DREB1E/ DDF2*, và *DREB1F/ DDF1* [74], [78]. *DREB1B*, *DREB1A* và *DREB1C* được sắp xếp theo thứ tự đó trong vùng 8,7 kb của bộ gen *Arabidopsis*; sự biểu hiện của ba gen *DREB1* này được gây ra bởi stress lạnh. Ba gen *DREB1* này chủ yếu hoạt động trong biểu hiện gen cảm ứng với stress lạnh ở *Arabidopsis* [81]. Sự biểu hiện của *DREB1D* là do mất nước [48], trong khi *DREB1F* được gây ra bởi độ mặn cao [103]. Các gen chính thống của *DREB1* đã được báo cáo ở nhiều loài thực vật một lá mầm, chẳng hạn như cây cải dầu (*Brassica napus*), bạch đàn (*Eucalyptus*), cà chua, lúa mạch, ngô, lúa, lúa mì và rừng ngập mặn [89], [100].

Nhóm nhân tố phiên mã DREB2 ở cây *Arabidopsis* gồm có 8 thành viên [108] và ở cây lúa có 5 thành viên [80]. Phân tích sự phát sinh chủng loại các protein DREB2 từ cây *Arabidopsis* và cây lúa, cũng như các protein liên quan cho thấy, phân nhóm DREB2 liên quan chặt chẽ với phân nhóm A-3 và phân nhóm DREB2 trong cây *Arabidopsis* và lúa có thể đều được chia thành ba phân nhóm phụ [80]. Phân nhóm DREB2 cũng đã được phân tích ở một số loài thực vật hạt kín khác như hướng dương [35], lúa [39], lúa mì [40], lúa mạch (*Hordeum vulgare*) [137], ngô (*Zea mays* L) [100]. Hầu hết các gen *DREB2* đã được công bố đều cảm ứng với sự mất nước hoặc nhiệt độ cao, nhưng các gen *DREB2* từ thực vật thân cỏ còn cảm ứng với lạnh [35], [80]. Điều đáng chú ý là tất cả các *DREB2* được phân lập có cảm ứng stress thuộc phân nhóm phụ 1, trong đó bao gồm *DREB2A*, *DREB2B*, *DREB2C*, *DREB2E* và *DREB2H* của cây *Arabidopsis*, cũng như *OsDREB2A* và *OsDREB2B* của cây lúa. Phân nhóm phụ 2 bao gồm *DREB2D*, *DREB2G* ở cây *Arabidopsis* và

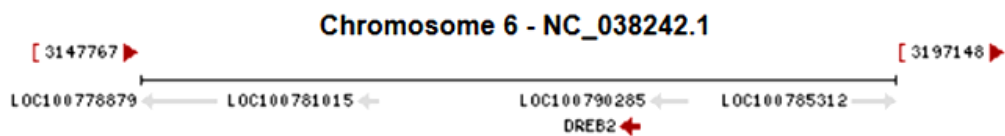
OsDREB2C ở cây lúa, trong khi phân nhóm phụ 3 gồm *DREB2F* ở cây *Arabidopsis* và *OsDREB2E* ở cây lúa. Các gen *DREB2* ở hai phân nhóm phụ này không có hoặc cảm ứng không đáng kể trước các stress và cũng chưa được phân lập từ các thực vật khác, mặc dù tất cả các loài thực vật hạt kín đều có các gen thuộc 2 phân nhóm phụ này, song vai trò của chúng còn ít được biết đến [80], [108]. Ở cây đậu tương, gen *GmDREB1* được xác định gồm nhiều bản copy. Kidokoro và cs (2015) đã xác định được 14 yếu tố phiên mã kiểu *DREB1* (*GmDREB1*) từ cơ sở dữ liệu bộ gen đậu tương. Sự biểu hiện của hầu hết các gen *GmDREB1* trong đậu tương được gây ra bởi nhiều loại stress phi sinh học, chẳng hạn như lạnh, khô hạn, muối cao và nóng. Các protein *GmDREB1* đã kích hoạt quá trình phiên mã thông qua *DRE* (yếu tố đáp ứng mất nước) ở cây *Arabidopsis* và đậu tương [63]. Sự biểu hiện của nhiều gen chức năng phản ứng với các stress phi sinh học cũng tăng lên khi biểu hiện quá mức *GmDREB1B* ở đậu tương. Gen *GmDREB1* có mã số FJ965342 và ID 547622 trên GenBank, nằm trên nhiễm sắc thể số 9 có kích thước 705 bp, mã hóa 234 amino acid (Hình 1.4A), còn gen *GmDREB1* (ID 547642) có kích thước 525 bp, mã hóa 174 amino acid (Hình 1.4B).

Chen và cs (2007) đã phân lập gen *GmDREB2* từ đậu tương và dựa trên sự giống nhau về miền AP2/ERF, gen *GmDREB2* được xếp vào phân nhóm A-5 trong phân họ *DREB*. Gen *GmDREB2* được biểu hiện mạnh trong môi trường stress hạn, mặn, nhiệt độ thấp và có ABA [29]. Trong cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB2*, sự biểu hiện của gen này đã làm tăng sự tích lũy hàm lượng proline [33]. Trong Ngân hàng gen, trình tự gen *GmDREB2* phân lập từ DNA của cây đậu tương đã được công bố lần đầu tiên bởi Wang và cs (2006) có kích thước 480 bp, mã hóa 159 amino acid, miền AP2/ERF có 59 amino acid (từ vị trí amino acid 34 đến 92) [132].



Hình 1.4. Vị trí của gen *GmDREB1* có ID là 547622 trên NST số 9 (A) và *GmDREB1* có ID là 547642 trên NST số 14 (B) của cây đậu tương [152]

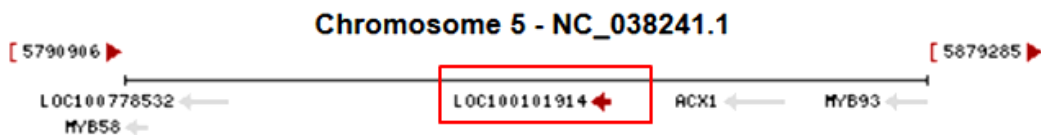
Gen *GmDREB2* ở cây đậu tương có chức năng kích hoạt sự phiên mã của nhóm gen chịu hạn. Sản phẩm biểu hiện của gen *GmDREB2* được tìm thấy khi cây đậu tương gặp hạn, lạnh và mặn. Như vậy, gen *GmDREB2* đã được chứng minh là tích cực tham gia vào việc chống chịu với stress hạn ở cây đậu tương [29], [64].



Hình 1.5. Vị trí của gen *GmDREB2* trên NST số 6 của cây đậu tương [153]

Gen *GmDREB6* ở cây đậu tương thuộc nhiễm sắc thể số 15 (Hình 1.5). Một số báo cáo bước đầu về cấu trúc gen *GmDREB6* đã được công bố.

Nghiên cứu của Lò Thị Mai Thu và cs (2018) cho thấy, gen *GmDREB6* (cDNA) đã được khuếch đại và tách dòng từ mRNA của giống đậu tương DT2008 với kích thước là 693 bp, mã hóa 230 amino acid. Trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* có sự sai khác ở 16 vị trí nucleotide và 8 vị trí amino acid suy diễn so với trình tự gen *GmDREB6* mang mã số EF551166, NM_001248412 trên GenBank [13]. Miền AP2 có 59 amino acid và có 11 amino acid liên kết với sợi DNA (ở vị trí 60, 61, 63, 65, 67, 69, 73, 75, 82, 84, 87). Gen *GmDREB6* trong hệ gen của cây đậu tương được xác định có chức năng chống chịu hạn và mặn [55].



Hình 1.6. Vị trí của gen *GmDREB6* trên NST số 5 của cây đậu tương [152]

1.2.2. Vai trò của DREB trong việc điều chỉnh phản ứng với stress phi sinh học ở thực vật

Phân nhóm DREB1 ở cây *Arabidopsis* bao gồm sáu gen [109]. *DREB1A/ CBF3*, *DREB1B/ CBF1* và *DREB1C/ CBF2* có khả năng cảm ứng và biểu hiện mạnh bởi nhiệt độ thấp [43]. Điều thú vị là sự hoạt hóa của các gen *CBF1- CBF3* để đáp ứng với nhiệt độ thấp cho thấy sự điều hòa của chúng có những điểm chung với sự điều hòa của các gen liên kết a/b (CAB) của diệp lục ở cây *Arabidopsis* [42]. Một số gen như *OsDREB1A*,

OsDREB1B, *OsDREB1C*, *OsDREB1D* phân lập từ cây lúa [57], *DREB1/CBF*, *ZmDREB1A* từ cây ngô [100] đã được công bố.

Các thử nghiệm liên kết với DNA của promoter cho thấy TF *AtDREB1A* có thể liên kết với cả *ACCGAC* và *GCCGAC*, nhưng *OsDREB1A* lại có sự liên kết ưu tiên với *GCCGAC* so với *ACCGAC* [39], [108]. TF *DREB1* có thể liên kết hiệu quả với yếu tố *cis* và có thể hoạt động cảm ứng các stress lạnh trong một con đường dẫn truyền tín hiệu mới [134]; một kết quả tương tự cũng được quan sát thấy đối với TF *OsDREBL* ở lúa [26].

Tuy nhiên, các nghiên cứu biểu hiện gen bằng phương pháp phân tích Real time qRT-PCR của gen *DREB/CBF* trong các loại cây trồng khác nhau đã cho thấy chúng được gây ra bởi các stress phi sinh học, đặc biệt là nhiệt độ thấp, tại các khoảng thời gian khác nhau. Ví dụ, gen *AtDREB1* biểu hiện trong vòng 10 phút ở 4°C [81]. Các bản sao mRNA của gen *CBF* có thể được phát hiện sau 30 phút tiếp xúc với 4°C với biểu hiện tối đa trong thời gian 1 giờ. Các gen *CBF1/DREB1B* và *CBF3/DREB1A* đã biểu hiện sau 15 phút xử lý lạnh, trong khi đó *CBF2/DREB1C* có tốc độ biểu hiện chậm hơn và biểu hiện ở mức tối đa sau 2,5 giờ tiếp xúc với lạnh và sau đó giảm dần [94]. TF *CBF4* ở cây *Arabidopsis* nhanh chóng được tổng hợp khi có tín hiệu hạn, nhưng không có phản ứng với stress lạnh [48]. *OsDREB1A* và *OsDREB1B* được tạo ra ngay sau khi tiếp xúc với lạnh (trong vòng 40 phút) nhưng không đáp ứng với ABA. *OsDREB1A* được tạo ra trong vòng 5 giờ khi bị stress mặn. Biểu hiện *OsDREB1D* không được phát hiện khi cây lúa sống trong điều kiện stress [39], [17]. *OsDREBL* cũng tích lũy nhanh chóng trong vòng 30 phút khi phản ứng với nhiệt độ thấp, nhưng không đáp ứng với ABA, NaCl và mất nước [26]. Sự biểu hiện của gen *WCBF2* từ lúa mì được hoạt hóa nhanh chóng ở nhiệt độ thấp và khô hạn nhưng không phải bởi ABA [66]. Ở cây lạc (*Arachis*

hypogaea), *PNDREB1* được điều hòa mạnh mẽ bằng cách xử lý ở nhiệt độ thấp, và cũng phản ứng với tình trạng mất nước [82]. Tuy nhiên, *CaDREBLP1* từ cây ớt cay có hiện tượng biểu hiện nhanh chóng do mất nước và độ mặn cao, nhưng hoàn toàn không bị ảnh hưởng bởi stress lạnh [51]. Sự biểu hiện của *PpDRF1* cũng được gây ra khi xử lý NaCl, lạnh và ABA trong cây *Physcomitrella patens* [73].

Cảm ứng của các gen *DREB/ CBF* là đặc trưng ở các cơ quan và tỷ lệ thuận với thời gian xử lý stress. *AhDREB1* được biểu hiện nhiều ở rễ nhưng biểu hiện ít hơn ở thân và lá trong phản ứng với mặn [120]. *OsDREB1F* được biểu hiện trong hầu hết các mô và cơ quan, bao gồm lá non, rễ non, lá trưởng thành, rễ trưởng thành và mô sẹo, trong đó biểu hiện ở hoa và mô sẹo cao hơn ở các mô khác [133]. Sự biểu hiện của gen *HvDREB1* trong lá lúa mạch chủ yếu được gây ra bởi muối, hạn hán và nhiệt độ thấp [137]. *GmDREBa* và *GmDREBb* cũng được gây ra bởi lạnh, khô hạn và muối trong lá của cây đậu tương, trong khi sự biểu hiện của *GmDREBc* ở rễ cao sau khi xử lý khô hạn, muối và ABA [70].

Trong số các protein liên kết DRE, phân họ DREB2 được gây ra bởi stress do hạn và độ mặn cao đã cho thấy vai trò quan trọng của chúng trong việc biểu hiện gen phản ứng với stress. *DREB2A* và *DREB2B* lần đầu tiên được phân lập dưới dạng cDNA mã hóa protein liên kết DRE/ CRT từ cây *Arabidopsis*. Tuy nhiên, trong số 8 protein loại DREB2, *DREB2A* và *DREB2B* được cho là những yếu tố phiên mã chính hoạt động dưới áp lực thâm thấu [109]. Các gen *DREB2* đã được phân lập từ các cây ngũ cốc quan trọng về kinh tế như lúa [39], lúa mì, lúa mạch [40], ngô [103], kê ngọc trai và kê đuôi chồn [16], [68]. Các bản sao *DREB2* đã phân lập được điều chỉnh bằng cách ghép nối thay thế ở lúa mạch, lúa mì, ngô và gạo, hầu hết chúng có khả năng chuyển hóa trong tế bào nấm men hoặc thực vật [16], [40], [103].

PgDREB2 từ cây kê ngọc trai được phosphoryl hóa bởi toàn bộ dịch chiết tế bào và không thể liên kết với trình tự DRE/ CRT [16].

Sự biểu hiện của *Arabidopsis DREB2A* và *DREB2B* được gây ra bởi sự mất nước và stress mặn cao, nhưng không phải do stress lạnh và ABA ngoại sinh [88]. Khi xử lý ABA, mannitol và lạnh ít có ảnh hưởng đến sự biểu hiện *DREB2C* nhưng mức độ tăng cao của mRNA *DREB2C* được phát hiện sau khi xử lý muối 250 mM [69]. Bản sao *OsDREB2A* được tạo ra trong vòng 24 giờ sau khi mất nước và stress muối 250 mM nhưng phản ứng yếu với ABA và stress lạnh [39]. Một phân tích toàn diện về tất cả *OsDREB2s* từ lúa cho thấy, *OsDREB2A* biểu hiện tăng lên khi xử lý nhiệt độ cao, hạn hán và độ mặn cao, nhưng không phải do nhiệt độ thấp [80]. Mức độ phiên mã của gen *OsDREB2B* đã tăng lên rõ rệt, đặc biệt là sau 20 phút ở nhiệt độ cao và 24 giờ ở nhiệt độ thấp. Mức độ phiên mã của *OsDREB2C* và *OsDREB2E* thấp ở đối chứng và không biểu hiện ở điều kiện stress phi sinh học [80]. Các gen *TaDREB1* và *WDREB2* (ở lúa mì) [40], *ZmDREB2A* (ở ngô) [103] và *PgDREB2* (ở kê ngọc trai) cũng đáp ứng với stress lạnh, trong khi *SiDREB2* (ở kê đuôi chồn) thì không [16], [68], [80]. *ZmDREB2A* cũng phản ứng với nhiệt độ cao [103]. Gen *SbDREB2* (Cây *Sorghum*) được cảm ứng khi tiếp xúc với khô hạn sau 1 giờ, sau đó biểu hiện giảm dần xuống mức cơ bản sau 24 giờ ở cây lúa chuyển gen [24]. Mức độ phiên mã của gen *CAP2* ở đậu xanh tăng lên trong điều kiện hạn, NaCl, ABA, và bổ sung auxin [123]. *DvDREB2A* (Hoa cúc) hầu như không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao, lạnh, hạn hán, ABA và các phương pháp xử lý muối cao [72]. Sự biểu hiện của *PeDREB2* (*Populus euphratica*) được gây ra bởi lạnh, hạn và độ mặn cao, nhưng không phải bởi ABA [27]. Sự tăng biểu hiện phiên mã của gen *SbDREB2A* từ loài cây chịu mặn *Salicornia Brachiata* trên cây *Arabidopsis* được gây ra bởi NaCl, hạn hán và stress nhiệt cũng được chứng minh [45].

AtDREB2A tích lũy trong rễ, thân và lá trong điều kiện sinh trưởng bình thường [74]. Sự biểu hiện *DREB2C* được quan sát thấy trong phôi trưởng thành và các lá mầm của cây con đang nảy mầm [69]. Almoguera và cs (2009) báo cáo rằng *HaDREB2* biểu hiện trong tất cả các mô sinh dưỡng. *DvDREB2A* của hoa cúc được biểu hiện ở tất cả các cơ quan trong điều kiện tự nhiên với sự tích lũy bản mã sao cao nhất trong khi sự tích lũy ít hơn được phát hiện ở rễ, thân và lá non [72]. Gen *SiDREB2* thuộc họ DREB loại A-2 biểu hiện mạnh trong lá, rễ và các cành non và trưởng thành của cây Kê đuôi chồn đã cho thấy vai trò của nó trong quá trình phát triển cũng như khả năng chống chịu với các stress phi sinh học [67].

1.2.3. Khả năng chống chịu stress thông qua việc biểu hiện mạnh nhân tố phiên mã DREB

Phân tích chức năng *in vivo* rất quan trọng để hiểu cơ chế phân tử của khả năng chống chịu các stress ở thực vật và cũng để cung cấp các công cụ có thể cải thiện năng suất cây trồng. Một cách quan trọng để đạt được khả năng chống chịu với nhiều điều kiện stress là biểu hiện quá mức các nhân tố phiên mã kiểm soát nhiều gen từ các con đường khác nhau. Trên thực tế, sự biểu hiện quá mức của một số nhân tố phiên mã DREB ở cây trồng chuyển gen đã làm tăng khả năng chịu hạn, mặn, nóng và chịu lạnh (Bảng 1.1).

Các cây *Arabidopsis* chuyển gen biểu hiện *DREB1B/CBF1* hoặc *DREB1A/CBF3* dưới sự kiểm soát của promoter CaMV35S cho thấy khả năng chống chịu mạnh với áp lực lạnh, hạn hán, độ mặn cao [58], [73]. Các con đường biểu hiện quá mức *DREB1A/CBF3* đã tăng tích lũy các chất bảo vệ thẩm thấu, chẳng hạn như proline và các loại đường khác nhau trong điều kiện không có stress [42].

Bảng 1.1. Sự biểu hiện quá mức của gen *DREB* phản ứng với các stress phi sinh học ở các cây chuyển gen

Gen DREB	Cây chuyển gen	Phản ứng với/chịu stress	Tài liệu tham khảo
<i>AtDREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Hạn hán	[74]
<i>AtDREB1A</i>	Thuốc lá	Lạnh và hạn hán	[60]
<i>AtDREB1A</i>	Lúa mì	Hạn hán	[99]
<i>AtDREB1A</i>	Lúa (Rice)	Hạn hán và mặn	[95]
<i>AtDREB2A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chưa xác định	[74]
<i>AtDREB1A</i>	Khoai tây	Mặn	[21]
<i>AtDREB1A</i>	Đậu phộng	Hạn hán	[23]
<i>AtDREB2A-CA</i>	<i>Arabidopsis</i>	Hạn hán	[109]
<i>AtCBF1</i>	<i>Arabidopsis</i>	Mặn	[57]
<i>AtCBF1</i>	Cà chua	Khô hạn và lạnh	[52]
<i>AtCBF1</i>	<i>Brassica napus</i>	Lạnh	[57]
<i>AtCBF1</i>	Cải dầu	Lạnh	[100]
<i>AtCBF3</i>	<i>Arabidopsis</i>	Lạnh	[44]
<i>AtCBF4</i>	<i>Arabidopsis</i>	Lạnh	[48]
<i>AtDREB2C</i>	<i>Arabidopsis</i>	Nhiệt độ cao	[70]
<i>OsDREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Hạn hán, mặn và lạnh	[39]
<i>OsDREB2A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chưa xác định	[39]
<i>OsDREB2B</i>	<i>Arabidopsis</i>	Khô hạn và khả năng chịu nhiệt	[80]
<i>OsDREB1F</i>	Lúa,	Hạn hán, mặn và lạnh	[129]

	<i>Arabidopsis</i>		
<i>OsDREB1G</i>	Lúa (Rice)	Hạn hán	[28]
<i>ZmDREB2A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Khô hạn và khả năng chịu nhiệt	[104]
<i>PgDREB2A</i>	Thuốc lá	Hyperionic and hyperosmotic stresses	[15]
<i>BNCBF5</i>	<i>Brassica napus</i>	Lạnh	[114]
<i>BNCBF17</i>	<i>Brassica napus</i>	Lạnh	[115]
<i>AhDREB1</i>	Lúa mì	Hạn hán và mặn	[120]
<i>GmDREB</i>	<i>Arabidopsis</i>	Lạnh	[121]
<i>LeCBF1-3</i>	<i>Arabidopsis</i>	Lạnh	[144]
<i>LeCBF1</i>	Thuốc lá	Lạnh	[144]
<i>GhDREB1</i>	Thuốc lá	Hạn hán, mặn và lạnh	[118]
<i>PpDBF1</i>	Thuốc lá	Hạn hán và mặn	[73]
<i>CAP2</i>	Thuốc lá	Mặn	[123]
<i>PeDREB2</i>	<i>Arabidopsis</i>	Mặn	[27]
<i>HvDREB1</i>	<i>Arabidopsis</i>	Hạn hán	[137]

Cây *Arabidopsis* chuyển gen và cây lúa biểu hiện quá mức gen *OsDREB1A* đã tăng cường khả năng chịu được nhiệt độ thấp, độ mặn cao và hạn hán [39], [100]. Tuy nhiên, sự biểu hiện quá mức của cả *AtDREB1A* và *OsDREB1A* ở cây *Arabidopsis* gây ra sự chậm phát triển nghiêm trọng trong điều kiện tăng trưởng tối ưu. Mức độ chống chịu stress và chậm phát triển ở cây *Arabidopsis* chuyển gen biểu hiện quá mức gen *OsDREB1A* thấp hơn so

với gen *AtDREB1A*, đây có thể do sự khác biệt về số lượng gen đích phản ứng với các stress gây ra [17].

Sự biểu hiện quá mức của các gen *DREB1/CBF* từ cây *Arabidopsis* ở cây *Brassica napus* chuyển gen hoặc cây thuốc lá đã gây ra sự biểu hiện của các gen mục tiêu và làm tăng khả năng chịu lạnh của cây chuyển gen [60], [100]. Gen *LeCBF1-3* (tương đồng *DREB1/CBF*) đã được báo cáo là có trong hệ gen cà chua (*Lycopersicon esculentum*) và có khả năng cảm ứng với điều kiện lạnh và sự biểu hiện quá mức ở cây *Arabidopsis* chuyển gen gây ra sự biểu hiện của các gen mục tiêu và tăng khả năng chịu lạnh [144]. Mặt khác, sự tăng cường biểu hiện của *CBF1/DREB1B* trong cà chua đã được chứng minh là làm tăng khả năng chịu lạnh và chịu hạn của cây cà chua chuyển gen [52], [53]. Tuy nhiên, sự tăng cường biểu hiện của *LeCBF1* hoặc *DREB1A* ở cây cà chua chuyển gen lại không làm tăng khả năng chịu lạnh [144].

Sự biểu hiện quá mức của *DREB1A/CBF3* được kích hoạt bởi promoter *rd29A* trong cây lúa mì chuyển gen đã cải thiện khả năng chống chịu với hạn [99]. Tương tự, sự biểu hiện quá mức *CBF3/DREB1A* bằng cách sử dụng promoter 35S trong cây lúa chuyển gen đã dẫn đến tăng khả năng chống chịu hạn và độ mặn cao mà không có bất kỳ sự ức chế sinh trưởng hoặc sai lệch về kiểu hình [95]. Sự biểu hiện quá mức của *BF4* dẫn đến cảm ứng gen có ở cây *Arabidopsis* cho thấy khả năng chống chịu băng giá và hạn cao hơn [48]. Cây chuyển gen *35S-TaDREB1* cho kiểu hình lùn, mặc dù điều này không được quan sát thấy ở các cây *Arabidopsis* chuyển gen tương ứng. Do đó, có thể một gen ở cây một lá mầm được chuyển sang các cây hai lá mầm có thể không hoạt động hiệu quả như ở cây một lá mầm [111].

Sự biểu hiện quá mức gen *PpDBF1* ở cây thuốc lá chuyển gen cho thấy khả năng chống chịu mặn, hạn và lạnh cao hơn cây không chuyển gen [73].

Sự biểu hiện quá mức của gen *AhDREB1* dẫn đến sự tích lũy các sản phẩm của gen mục tiêu và cho tỷ lệ sống sót tốt hơn cho cây thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn so với cây wild-type (WT) [120]. Các kết quả này cũng nhất quán với sự biểu hiện quá mức của *OsDREB1F* trong việc nâng cao khả năng chống chịu với độ mặn cao, hạn hán và nhiệt độ thấp ở cả cây lúa và cây chuyển gen *Arabidopsis* [133].

Sự biểu hiện quá mức của *DREB2A* không dẫn đến bất kỳ thay đổi kiểu hình nào ở cây *Arabidopsis* chuyển gen cũng như không cải thiện khả năng chống chịu [74]. Busk và Page cũng báo cáo rằng quá trình phosphoryl hóa có thể cần thiết cho sự hoạt hóa của các protein trong điều kiện khô hạn, do đó tăng cường hoạt động liên kết với DNA của một số protein điều hòa phiên mã. Vùng trung tâm của nhân tố phiên mã DREB2A chứa miền điều hòa âm được biết đến thông qua phân tích bằng cách sử dụng nguyên bào *Arabidopsis* và sự loại bỏ các amino acid 136 đến 165 làm cho DREB2A hoạt động mạnh mẽ. Sự biểu hiện quá mức của gen *DREB2A-CA* dẫn đến sự chậm phát triển ở cây *Arabidopsis* chuyển gen, không có khả năng chống chịu hạn, nhưng chịu được điều kiện lạnh ở mức thấp [109]. Protein tái tổ hợp DREB2A-CA-GFP chứng minh sự biểu hiện gen ổn định trong nhân, tuy nhiên, điều tương tự không xảy ra với protein tái tổ hợp DREB2A-FL-GFP, điều này cho thấy rằng vùng trung tâm của DREB2A là cần thiết để điều chỉnh sự ổn định của gen [87].

Mặc dù *DREB2A* và *DREB1A* được phân lập cùng nhau [74], người ta thấy rằng một số gen mục tiêu của *DREB2A* khác với gen của *DREB1A* [87]. Lý do cho điều này có thể là do cả DREB2A và DREB1A hơi khác nhau về vị trí đặc trưng liên kết với DNA. Trong khi DREB2A ưu tiên liên kết với các motif ACCGAC, DREB1A lại liên kết với các motif có trình tự A/GCCGACNT [109]. Kết quả phân tích microarray ở cây *Arabidopsis*

chuyển gen cho thấy sự biểu hiện quá mức *DREB2A-CA* kích hoạt sự biểu hiện của các gen chịu hạn và gen liên quan đến sốc nhiệt (Heat shock- HS) và những cây chuyển gen được cải thiện khả năng chịu nhiệt [110]. Người ta cũng quan sát thấy rằng các gen quy định *DREB2A* được điều chỉnh giảm ở các đột biến loại trực tiếp *DREB2A* trong điều kiện stress [139]. Sự biểu hiện quá mức của *DREB2C* cũng được phát hiện là gây ra sự biểu hiện của nhiều gen sốc nhiệt, đảm bảo khả năng chịu nhiệt của cây *Arabidopsis* chuyển gen [70]. Gần đây, người ta đã chỉ ra rằng *HsfA3* điều hòa sự biểu hiện của nhiều gen cảm ứng nhiệt của *DREB2A* và có chức năng tăng khả năng chịu nhiệt dưới sự kiểm soát của nhân tố phiên mã *DREB2A* [115], [141]. Các phân tích gần đây về các phản ứng di truyền liên quan đến sự thích nghi của thực vật với nhiệt độ cao cũng chỉ ra rằng *AtDREB2B* và *AtHSFA3* là hai TF duy nhất được tạo ra đặc biệt trong các dòng cây *Arabidopsis* chịu nhiệt [115], tuy nhiên, cây đột biến *DREB2A-1* cho thấy khả năng chịu nhiệt cơ bản giảm khi được xử lý trực tiếp ở 46°C trong 45 phút [67]. Tổng hợp lại, có thể nhận xét rằng nhân tố phiên mã *DREB2* hoạt động trong điều kiện mất cân bằng thẩm thấu và phản ứng với nhiệt độ môi trường.

Về sự ảnh hưởng đến kiểu hình, các nghiên cứu cho rằng tùy thuộc vào gen *DREB2* và từng loài mà có thể làm thay đổi hay không thay đổi về kiểu hình. Sự biểu hiện quá mức của *OsDREB2A* ở lúa không dẫn đến bất kỳ thay đổi kiểu hình nào ở cây *Arabidopsis* chuyển gen, nhưng sự biểu hiện quá mức của *WDREB2* (lúa mì) và *ZmDREB2A* (ngô) đã gây ra những thay đổi ở cây *Arabidopsis* chuyển gen và thuốc lá [39], [64], [103]. Gần đây, Bihani và cs (2011) báo cáo rằng sự biểu hiện *SbDREB2* được kích hoạt bởi promoter CaMV35S đã dẫn đến các hiệu ứng toàn thân ở cây lúa và những cây chuyển gen này không tạo ra hạt. Tuy nhiên, cây lúa mang cấu trúc *rd29A:SbDREB2* lại làm đòng và có số bông lúa cao hơn đáng kể so với cây lúa wild-type. Các

đặc điểm hình thái học và nông học cũng không bị ảnh hưởng ở lúa chuyển gen *rd29A:SbDREB2* [24]. Sự biểu hiện quá mức của *HaDREB2* trong hạt không kéo dài thời gian sinh trưởng ở thuốc lá chuyển gen. *HaDREB2* thể hiện quá mức không làm tăng khả năng chịu nhiệt ở cây con hoặc dẫn đến sự tích tụ các protein HSP ở nhiệt độ bình thường [20].

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.

1.3. KỸ THUẬT CHUYỂN GEN TRONG NGHIÊN CỨU CẢI THIỆN ĐẶC TÍNH CHỐNG CHỊU CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG

1.3.1. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

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

Gần đây dữ liệu hệ gen học được phát triển dựa trên những thông tin về trình tự các gen trong hệ gen của cây đậu tương và một khối lượng lớn thông tin về giải mã hệ gen cây đậu tương có thể tìm thấy ở Ngân hàng gen quốc tế. Ngoài ra, nguồn thông tin khác cũng được phát triển, như dữ liệu EST (expressed

sequence tag), thư viện cDNA, microarray. Đây là cơ sở dữ liệu của việc ứng dụng các tiến bộ chọn giống đậu tương bằng chỉ thị phân tử và kỹ thuật chuyển gen, là cơ sở của những hiểu biết về chức năng gen thông qua tách dòng gen và phương pháp di truyền ngược. Trên cơ sở đó, nghiên cứu xây dựng một hệ thống chuyển gen ổn định và có hiệu quả ở cây đậu tương là điều cần thiết đi tới thành công trong chiến lược chọn giống đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Hai nhóm phương pháp được ứng dụng trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp. Trong đó, phương pháp gián tiếp thông qua *A. tumefaciens* được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương. Khác với các phương pháp chuyển gen trực tiếp ở thực vật, phương pháp chuyển gen gián tiếp được thực hiện thông qua vi khuẩn đất *A. tumefaciens*. Đối với cây đậu tương, phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* được ứng dụng từ năm 1993 và hiện nay đã đạt được những thành tựu rất đáng khích lệ [25].

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

Agrobacterium là loài vi khuẩn đất Gram âm gây bệnh khối u ở thực vật và có khả năng lây nhiễm một cách tự nhiên giữa các loài thực vật khác nhau. *Agrobacterium* có thể gây ra bệnh khối u (*A. tumefaciens*) và gây bệnh rễ tơ (*A. rhizogenes*) phổ biến trên nhiều loài thực vật. *A. tumefaciens* chủ yếu lây nhiễm vào thực vật qua các vết thương và do vậy có thể coi *A. tumefaciens* là một công cụ sử dụng để chuyển các gen mong muốn vào cây đậu tương [48].

Ưu điểm của phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* là đơn giản, quen thuộc và yêu cầu tối thiểu về dụng cụ, dễ dàng chuyển một gen đơn lẻ vào cây chủ hoặc chỉ cần số bản copy thấp. Chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở đậu tương trong môi trường đồng nuôi cấy được tiến hành trên nách lá mầm [96] mà khởi nguồn phương pháp này dựa vào kiểu gen đậu tương mầm cảm với *A. tumefaciens* và khả năng tái sinh cây từ nách lá mầm. Nách lá mầm là phần nối giữa lá mầm và thân chứa các tế bào mầm có khả năng phát sinh chồi và tăng sinh trong môi trường nuôi cấy chứa cytokinin. Mức độ hình thành chồi ở nách lá mầm phụ thuộc vào loại cây sử dụng chuyển gen.

Những cây đậu tương chuyển gen đầu tiên mang cấu trúc gen *npII* đã sử dụng kháng sinh kanamycin làm chất chọn lọc và đến nay các dòng tế bào chuyển gen đã sử dụng các chất chọn lọc bởi sự kết hợp gen *bar* và *glufosinate*. Nồng độ chất chọn lọc có ảnh hưởng lớn đối với tần suất chuyển gen [138], vì thế phương pháp lựa chọn chất chọn lọc là khác nhau giữa các kiểu gen đậu tương. Các giống có thời gian sinh trưởng ngắn có thể sử dụng để phát triển các dòng đậu tương chuyển gen. Zeng và cs (2004) cho rằng, hiệu suất chuyển gen có thể đạt từ 0,2% đến khoảng 10% và hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào kỹ thuật và kiểu gen của đậu tương [142].

Kỹ thuật chuyển gen ở thực vật nói chung và chuyển gen ở cây đậu tương nói riêng được hiểu đầy đủ là: (i) gen ngoại lai (gen chuyển) phải được hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ; (ii) gen chuyển phải được biểu hiện ở tế bào chủ; (iii) gen chuyển phải được di truyền cho các thế hệ sau; (iv) trong mỗi thế hệ sản phẩm của gen chuyển phải được biểu hiện, và (v) sản phẩm của gen chuyển biểu hiện được chức năng sinh học [9]. Chính vì vậy quá trình chọn lọc, phân tích cây chuyển gen trong mỗi thế hệ được thực hiện bằng hệ thống chọn lọc tế bào và mô chuyển gen, xác định sự có mặt của gen chuyển trong

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

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

Biểu hiện gen là quá trình hoạt động của gen để tạo ra sản phẩm cuối cùng là protein. Quá trình biểu hiện gen được thể hiện qua hai giai đoạn: (1) Phiên mã từ DNA sang mRNA và (2) Dịch mã từ mRNA tổng hợp các phân tử protein thông qua bộ máy ribosome. Để xác định sự có mặt của sản phẩm phiên mã có thể sử dụng kỹ thuật RT-PCR, real-time RT-PCR, lai Northern blot. Đối với các bệnh do virus ở thực vật, người ta có thể sử dụng kỹ thuật real-time RT-PCR để đánh giá cây chuyển gen kháng virus thông qua phiên mã để phát hiện và định lượng virus trên cây nhiễm bệnh [112]. Để đánh giá sự có mặt của protein tái tổ hợp do gen chuyển tạo ra có thể thực hiện một số

kỹ thuật khác nhau như kỹ thuật Western blot, ELISA và các kỹ thuật phát hiện hoạt động của protein (hoặc enzyme).

1.3.2. Nghiên cứu cải thiện khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh ở cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen

Hạn hán và nhiễm mặn là yếu tố ngoại cảnh bất lợi làm giảm năng suất và sản lượng cây trồng. Hướng tiếp cận chủ yếu hiện nay trong việc cải thiện tính chống chịu các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh thông qua việc chuyển các gen chức năng liên quan trực tiếp đến tính chống chịu hoặc chuyển gen mã hóa protein là nhân tố kích hoạt quá trình phiên mã từ các giống cây chống chịu tốt sang giống chống chịu kém.

Bảng 1.2. Một số gen *DREB* được sử dụng trong chuyển gen trong mục đích nâng cao khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học của một số cây trồng và đậu tương

Gen	Đối tượng	Kiểu hình	Tài liệu tham khảo
<i>DREB2/DREB3</i>	Lúa mì, lúa mạch	Chịu hạn và băng giá	[83]
<i>DREB1A</i>	Lúa, thuốc lá	Chịu hạn, mặn, lạnh	[60], [95]
<i>DREB1/OsDREB1</i>	Lúa	Chịu hạn, mặn và lạnh với tốc độ tăng trưởng giảm	[56]
<i>ZmDREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu hạn	[103]
<i>OsDREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu hạn, mặn, băng giá	[39]
<i>DREB</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu hạn, lạnh	[60]

<i>OsDREB2A</i>	Đậu tương	Chịu mặn	[146]
<i>GmDREB1</i>	Lúa mì	Chịu hạn	[141]
<i>GmDREB2</i>	Thuốc lá, đậu tương	Chịu hạn, mặn	[130]
<i>GmDREB6</i>	Đậu tương	Chịu mặn	[55]
<i>GmDREB5</i>	Thuốc lá	Chịu hạn	[136]

Tăng cường biểu hiện gen điều hoà quá trình phiên mã của các gen chức năng có khả năng đáp ứng hạn và mặn là một cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong sự phát triển cây trồng chống chịu và ưu việt hơn kỹ thuật chuyển gen chức năng đơn lẻ. Nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan đến các stress phi sinh học, đặc biệt là hạn, mặn và lạnh được nhận thấy rõ nhất là các gen *DREB* [46], [106]. Nhiều báo cáo về sự biểu hiện mạnh của nhân tố phiên mã *DREB* cảm ứng với stress phi sinh học đã kích hoạt sự biểu hiện của các gen mục tiêu có trình tự DRE trong các promoter của chúng và kết quả cho thấy cây chuyển gen có khả năng chống chịu stress tốt hơn cây không chuyển gen (Bảng 1.2).

Cây đậu tương chuyển gen mã hóa P5CR L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase xúc tác cho phản ứng tổng hợp proline, dưới sự điều khiển của promoter sốc nhiệt đã làm tăng khả năng chịu hạn và chịu nóng cao hơn cây đối chứng [34], [143].

Cũng hướng nghiên cứu này, một số nhóm nghiên cứu đã thành công trong tạo dòng đậu tương chuyển gen có khả năng chống chịu hạn và mặn cao hơn cây không chuyển gen [5], [55], [129], [130]. Hướng nghiên cứu biểu hiện mạnh những gen điều hoà phiên mã các gen chức năng có khả năng đáp ứng hạn, mặn là một cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong sự phát triển các giống cây trồng chống chịu hạn, mặn và ưu việt hơn kỹ thuật chuyển gen chức năng

đơn lẻ. Vì vậy, việc tăng cường khả năng điều tiết của một nhân tố phiên mã quan trọng kích thích sự biểu hiện của nhiều gen mục tiêu kiểm soát các đặc tính tương quan là rất quan trọng. Nhiều gen giữ vai trò quan trọng đã được xác định có liên quan đến mạng lưới điều hòa trong điều kiện stress phi sinh học [116]. Có thể nói rằng, nhóm gen *TF* liên quan đến stress phi sinh học, đặc biệt là hạn và mặn được nhận thấy rõ nhất là ở các gen *DREB* [46], [100].

Nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương qua *Agrobacterium* được Trần Thị Cúc Hòa (2007) tiến hành thử nghiệm trên 4 phương pháp lây nhiễm khác nhau, trong đó tạo vết thương tại mặt trong của nách lá mầm với dung dịch có chứa vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 21°C là có hiệu quả, với tỷ lệ chuyển gen đạt hiệu suất cao [4]. Nguyễn Thị Thúy Hương (2009) đã tối ưu quy trình tái sinh và chuyển gen thông qua nách lá mầm đậu tương và nhận xét rằng, giống đậu tương DT84 là đối tượng phù hợp để tiến hành các thí nghiệm chuyển gen và đã chuyển thành công cấu trúc gen *RD29A/P5CSm* vào giống đậu tương DT84, tạo được cây đậu tương mang gen đột biến loại bỏ ức chế phản hồi làm tăng cường khả năng tổng hợp proline khi cây đậu tương bị hạn [5], [6], [7]. Nguyễn Thu Hiền (2011) đã thành công tái sinh đa chồi từ nách lá mầm hạt chín của 2 giống đậu tương DT12 và DT84 và thử nghiệm chuyển được gen *gus*, hiệu suất chuyển gen kiểm tra ở giai đoạn hạt khoảng 7,6% ở giống DT12 và 4,0 % với giống DT84. Kết quả đã tạo được 8 dòng đậu tương ở thế hệ T1 mang cấu trúc vector biểu hiện đặc trưng trong hạt SLHEP-HAI, dương tính với phản ứng PCR sang thế hệ T2 dòng đậu tương H11 mang đoạn gen HA1 nhận được đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp HAI trong hạt của dòng đậu tương này [3]. Tiếp theo là những nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen kháng virus SMV, BYMV của Lò Thị Mai Thu và cs (2014) [13], nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong tạo dòng đậu tương chuyển gen có bộ rễ phát triển của Lò Thanh Sơn và cs (2015) [11].

Tính di truyền của khả năng chịu mặn ở đậu tương trước đây được phân tích như một tính trạng chất lượng bằng cách sử dụng phương pháp di truyền học cổ điển, và các ký hiệu gen *Ncl* và *ncl* được đề xuất là gen trội và gen lặn cho tính chống chịu mặn. Rễ đậu tương của các cây chống chịu và nhạy cảm hấp thụ các ion clorua với số lượng tương đương, nhưng sự chuyển vị sau đó của clorua cao hơn trong cây được kiểm soát về mặt di truyền. Abel đã thực hiện phép lai giữa các cặp bố mẹ có khả năng tích lũy clorua tương tự nhau, và nhận thấy rằng các thế hệ F2 và F3 tương tự như bố mẹ về hàm lượng clorua. Kết quả là, các cây F2 đã phân ly từ tám phép lai với tỷ lệ 3 : 1. Những kết quả này cho thấy rằng sự tích tụ clorua ở phần trên của đậu tương được kiểm soát bởi một locus duy nhất với loại trừ là trội (*Ncl*) và loại trừ là lặn (*ncl*) [14]. Theo cách tiếp cận biểu hiện quá mức gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB ở đậu tương, Dao Xuan Tan và cs (2015), Pham và cs (2020) đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức gen *GmDREB2* từ đậu tương đã làm tăng tích lũy hàm lượng proline và khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây thuốc lá và cây đậu tương được cải thiện [33], [101]. Nghiên cứu của Nguyen và cs (2019) về chuyển gen *GmDREB6* vào giống đậu tương DT84 đã chỉ ra rằng, mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6* và sự tích lũy proline của cây đậu tương chuyển gen tăng lên ở thế hệ T2 và cao hơn so với ở cây đại (WT) trong điều kiện bình thường và stress mặn. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của sự biểu hiện quá mức của gen *GmDREB6* trong việc tăng tích lũy proline ở cây đậu tương biến đổi gen và gợi ý rằng *GmDREB6* có thể hoạt động như một ứng cử viên tiềm năng cho công nghệ gen để cải thiện khả năng chịu mặn của đậu tương [93].

Stress do muối là một trong những stress phi sinh học ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương. Việc cải thiện đặc tính di truyền để tăng khả năng chống chịu mặn là một cách hiệu quả để bảo vệ năng suất

đậu tương trong điều kiện stress mặn. Tính đa dạng di truyền và di truyền tính chịu mặn ở đậu tương, đồng thời phân tích nghiên cứu liên kết toàn bộ bộ gen ở đậu tương đã được tổng kết [31]. Nghiên cứu khả năng chịu mặn ở đậu tương theo cách tiếp cận tìm kiếm các locus mới chịu mặn ở đậu tương bằng lập bản đồ liên kết toàn bộ gen có độ phân giải cao cũng đã được báo cáo [37]. Công nghệ chỉnh sửa hệ gen *CRISPR/Cas9* và công nghệ chọn lọc bộ gen để nhân giống phân tử chịu mặn ở đậu tương cũng được thảo luận cho hướng nghiên cứu trong tương lai [31].

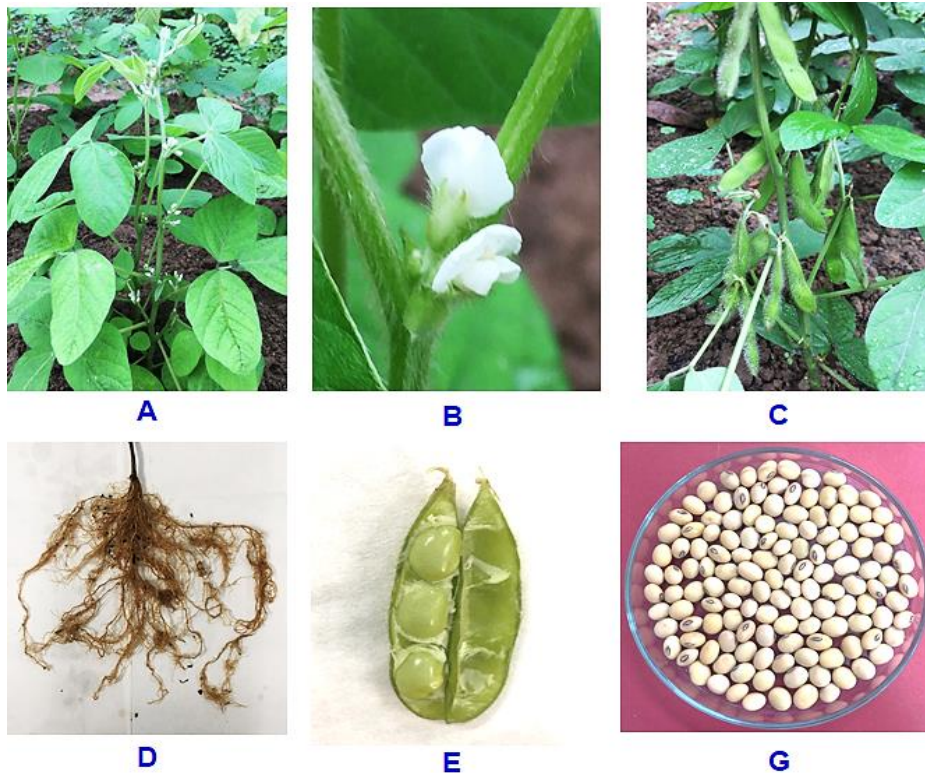
Các DREB ở đậu tương thuộc họ AP2 là một yếu tố phiên mã hoạt động liên kết với trình tự *cis* của promoter để kích hoạt sự biểu hiện của gen mục tiêu trong đậu tương khi có tín hiệu stress phi sinh học từ ngoại cảnh [29], [116]. Miền AP2 có khoảng 58 hoặc 59 amino acid, bao gồm một số amino acid liên kết với yếu tố phản ứng mất nước (DRE) hoặc hộp GCC [128]. 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 [90]. 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, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu

Hạt của giống đậu tương DT22 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp. Hạt đậu tương được gieo trồng tại vườn thí nghiệm khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên để thu hạt làm nguyên liệu chuyển gen (Hình 2.1).



Hình 2.1. Hình ảnh của một số giai đoạn phát triển ở giống đậu tương DT22 được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen

A, B: Giai đoạn ra hoa; C: Giai đoạn quả chắc; D: Rễ cây đậu tương giai đoạn ra hoa; E: quả 3 hạt; G: Hạt đậu tương (Ảnh chụp của tác giả).

Giống ĐT22 do trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ chọn tạo từ dòng đột biến của hạt lai (DT95 x DT12). Thời gian sinh trưởng của cây trung bình 85- 90 ngày. Chiều cao cây đạt từ 45- 70 cm và chống đổ tốt. Giống ĐT22 có hoa màu trắng, phân cành trung bình, số quả chắc trung bình đạt từ 25- 45 quả/cây, có khoảng 16- 20% số quả có 3 hạt. Hạt màu vàng sáng, rón hạt màu nâu đậm, nâu đen. Khối lượng 1000 hạt dao động từ 155- 160g, thời gian sinh trưởng trung bình 85- 90 ngày. Giống có thể trồng được 3 vụ trong năm, chống chịu đất ướt và nhiễm bệnh mức nhẹ đến trung bình đối với một số bệnh hại chính, giống ĐT22 kháng bệnh phấn trắng. Giống ĐT22 sinh trưởng, phát triển tốt trên đất phù sa, cát pha, đất màu, đất sau lúa mùa ở các tỉnh phía Bắc, Duyên Hải Nam trung bộ như Hà Nội, Hà Nam, Thái Bình, Vĩnh phúc, Cao bằng, Sơn La, Bắc Cạn, Điện biên... Năng suất trung bình từ 18-27 tạ/ha, tùy thuộc vào mùa vụ và điều kiện thâm canh. Giống đậu tương ĐT22 được đánh giá có khả năng chịu mặn thấp [1], do vậy giống ĐT22 được chọn làm vật liệu nghiên cứu chuyển gen *GmDREB6*.

Cây thuốc lá (*Nicotinana tabacum*) giống K326 được sử dụng làm cây mô hình để phân tích hoạt động và biểu hiện của cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6*. Giống K326 là giống thuốc lá được Công ty Novatis lai tạo từ tổ hợp lai Mc Nair 225 (coker 139 x coker 319) x (NC nair 30 x NC 95), sản xuất và đưa ra từ năm 1982, ở trên thế giới giống này đang được trồng rất phổ biến. Giống này có ưu điểm lớn nhất là sinh trưởng tốt và ra hoa sớm. Giống K326 được nuôi cấy *in vitro* và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

Chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

2.1.2. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Môi trường cơ bản MS có bổ sung vitamin B5 [85], các chất điều hòa sinh trưởng như Benzyl amino purine (BAP), Indol - 3 - butiric acid (IBA)...; kháng sinh kanamycin, cefotaxim; Các hóa chất khác như yeast extract, bacto pepton, trypton, NaCl, agar, sucrose, glycerol, acetosyringone, L- cystein, Na₂S₂O₃ phosphinothricin được cung cấp bởi các hãng, như New England Biolabs (Anh), Amersham Pharmacia Biotech (Thụy Điển), Chemicals (Đức), Sigma (Mỹ), Duchefa (Hà Lan), Merck (Đức) và Wako (Nhật Bản), bột MS (BioWorld, USA).

Các loại Kit được sử dụng trong thao tác phân tử được mua từ các hãng Fermentas, Bio-Neer như: Kit Trizol Reagents – tách chiết RNA tổng số; kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis – tổng hợp cDNA; kit Gene JEP PCR Purification – tinh sạch sản phẩm PCR; kit Plasmid Extraction – tách chiết plasmid từ vi khuẩn.

Tủ cấy, máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transillumination, Bio-Rad, Mỹ), máy Voltex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Plulser, máy xác định hàm lượng nucleic acid Nano Drop, cùng với các thiết bị hiện đại khác.

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 [152], trong đó có các trình tự gen *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB5*, *GmDREB6* được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam [153], [154].

Xác định các gen DREB trong hệ gen đậu tương

Các protein thành viên phân họ DREB chỉ chứa một miền AP2, do vậy xác định các thành viên của phân họ gen *DREB* trong hệ gen đậu tương được tra cứu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI [152], kết hợp kiểm tra vùng AP2 của protein DREB trên cơ sở dữ liệu họ protein Pfam.

Phân tích phát sinh phân họ gen DREB ở đậu tương

Phân tích phát sinh chủng loại phân tử thực hiện bằng phần mềm MEGAX theo phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei [65] với bootstrap được lặp lại 1000 lần [119]. Các trình tự gen *DREB* đã xác định được phân tích bằng ClustalW và một cây phát sinh được thiết lập thể hiện sự tiến hóa của phân họ gen *DREB* ở đậu tương.

Phân tích phát sinh miền AP2 trong phân họ protein DREB ở đậu tương

Lịch sử tiến hóa của miền AP2 trong phân họ nhân tố phiên mã DREB ở đậu tương được suy luận theo phương pháp Maximum Likelihood và mô hình JTT matrix-based [58] với bootstrap được lặp lại 1000 lần trong MEGAX [65]. Trình tự amino acid của miền AP2 được phân tích bằng ClustalW và sơ đồ cây được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid của miền AP2 [65].

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

2.2.2.1. Thiết kế vector chứa cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* và tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp

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 *cmv* và vị trí cắt của cặp enzyme *Xba*I/ *Sac*I (*GmDREB6_cmv*); (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. Dòng vi khuẩn cho sản phẩm colony-PCR được nuôi trong LB lỏng, giữ chủng trong LB đặc và dùng cho lây nhiễm trong chuyển gen.

2.2.2.2. Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm

Vi khuẩn *A.tumefaciens* mang gen chuyển *GmDREB6* được nuôi chọn lọc trong 15ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C lắc 200 rpm, 48 giờ. Chuyển 10ml dịch huyền phù tế bào trên vào 50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi 28°C, lắc 200 rpm đến khi $OD_{600nm} = 0,8$ là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp. Ly tâm toàn bộ dịch tế bào ở 4°C, 5000 rpm, 15 phút. Hoà tan tế bào lắng vào 40ml dung dịch $\frac{1}{2}$ MS + AS 50 μ l đặt trong nước đá lạnh.

Bảng 2.1.Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường	Thành phần
LB lỏng	Bacto pepton 10 g/l + Nacl 10 g/l + Yeast Extract 5 g/l, pH = 7
LB đặc	LB lỏng + agar 16g/l

2.2.2.3. Chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vào thuốc lá

Biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* thông qua *A.tumefaciens* vào giống thuốc lá K326 được thực hiện theo phương pháp của Topping (1998) [131]. Lá cây thuốc lá được cắt thành từng mảnh mô có kích thước 1,0 x 1,0 cm, ngâm các mảnh lá trong dung dịch huyền phù tế bào vi khuẩn

A.tumefaciens tái tổ hợp trong thời gian 10 phút. Sau khi nhiễm khuẩn, các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy và tái sinh *in vitro* (Bảng 2.2).

Bảng 2.2. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá chuyển gen

Hỗn hợp	Thành phần môi trường
Stock I	KNO ₃ 1,9 g + KH ₂ PO ₄ 0,17 g + NH ₄ NO ₃ 1,65 g + MgSO ₄ 0,37 g (Thể tích: 1000 ml)
Stock II	CaCl ₂ 0,44 g (Thể tích: 1000 ml)
Stock III	H ₃ BO ₃ 6,2 mg + MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg + CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg + CuSO ₄ .7H ₂ O 0,025 mg + ZnSO ₄ .7H ₂ O 8,6 mg + Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg + KI 0,83 mg (Thể tích: 1000 ml)
Stock IV	FeSO ₄ 27,8 mg + Na ₂ EDTA 37,3 mg (Thể tích: 1000 ml)
Stock V	Myo-Inositol 100 mg + Thiamine HCl 0,1 mg + Pyridoxine HCl 0,5 mg + Nicotic acid 0,5 mg + Glycine 2 mg (Thể tích: 1000 ml)
MS	20 ml/l stock I + 10 ml/l stock (II, III, IV, V)
½MS	10 ml/l stock I + 5 ml/l stock (II, III, IV, V)
Môi trường tái sinh chồi	MS + BAP 1,0 mg/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + kanamycin 50 mg/l + cefotaxime 500 mg/l
Môi trường ra rễ	MS + IBA 0,5 mg/l + MES 1.0 g/l + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + nước dừa 100 ml/l + kanamycin 50 mg/l + cefotaxime 500 mg/l

*** Ghi chú:** Môi trường MS ở dạng dung dịch. Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25 ± 2°C, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ ngày.

Các mẫu sau lây nhiễm được đồng nuôi cấy trong tối 2 ngày, sau đó mẫu được rửa sạch khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/ml và được thấm khô trên giấy thấm khử trùng. Các mẫu tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường tái sinh tạo đa chồi (môi trường MS có bổ sung BAP và kanamycin để chọn lọc cây chuyển gen), các mẫu được đều đặn cấy chuyển sang môi trường mới sau khoảng hai tuần. Các chồi sống sót được chuyển sang môi trường tạo rễ có bổ sung kanamycin. Các cây con được huấn luyện và trồng trong nhà lưới.

2.2.2.4. Phương pháp xác định sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong 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) [107]. 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* (Bảng 2.3).

Bảng 2.3. Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR sử dụng để xác định sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong cây thuốc lá chuyển gen

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5' – 3')	Nhiệt độ tiếp hợp mồi (°C)	Kích thước
<i>XbaI-DREB6-F/ DREB6-SacI-R</i>	ATGAAGTTCAACCAACCACTTCA T	58	741 bp
	ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAG T		

Thành phần của phản ứng PCR được trình bày ở bảng 2.4. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gen *GmDREB6* là 94°C/3 phút 30 giây; (94°C/30

giây; 58°C/50 giây; 72°C/1 phút 20 giây) lặp lại 30 chu kỳ; 72°C/10 phút; 4°C: ∞.

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
Nước deion	-	8,5
Master mix	2 X	12,5
Primer (F+ R)	10 pmol/μl	2,0
DNA/cDNA	100 ng/μl	2,0
<i>Tổng thể tích</i>		25

Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và nhuộm bằng EtBr, sau 10 phút tiến hành chụp ảnh dưới ánh sáng cực tím và phân tích kết quả.

Sự hợp nhất của gen chuyển *GmDREB6* vào hệ gen của cây thuốc lá chuyển gen được xác định bằng kỹ thuật phân tích Southern blot (1975) [126]. Trình tự DNA của mẫu dò được đánh dấu bằng Biotin DNA DecaLabel, sử dụng biotin-11-dUTP. Gen *GmDREB6* được khuếch đại bằng cách sử dụng PCR với cặp mồi *XbaI-DREB6-F/ DREB6SacI-R*. Các mẫu DNA tổng số từ cây thuốc lá chuyển gen dương tính với PCR ở thế hệ T₀ được cắt bằng enzyme giới hạn *SacI* ở 37°C. Các phân đoạn DNA thu được được kiểm tra, đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose và sau đó các đoạn DNA được chuyển từ gel điện di sang màng lai và thực hiện lai với DNA mẫu dò. Màng được lai ở 44°C. Kết quả lai được hiển thị trên phim X-quang.

2.2.2.5. Phương pháp tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách từ lá cây chuyển gene bằng Trizol™ Reagent (Invitrogen) [155].

cDNA được tổng hợp từ RNA bằng bộ Kit tổng hợp cDNA Maxima® First Strand (Fermantas). Các bước thực hiện:

- (1) Nghiền mịn mẫu lá của các dòng cây thuộc lá, đập tương trong nitơ lỏng, lấy 300 mg bột mẫu vào eppendorf 2ml đã khử DEPC.
- (2) Bổ sung 1ml Trizol, trộn đều mẫu, ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút.
- (3) Bổ sung 1ml hỗn hợp chloroform: isoamylalcohol (24:1), lắc mạnh trong 15 giây, ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút.
- (4) Li tâm 13000vòng/phút trong 10 phút, hút 600μl dịch phía trên chuyển sang Eppendorf 1,5ml đã khử DEPC.
- (5) Bổ sung 500 μl isopropanol, lắc nhẹ, đặt mẫu trong tủ -20°C trong 30 phút để tủa RNA. Li tâm 13000vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch thu cạn.
- (6) Bổ sung 500 μl cồn 70° để rửa. Li tâm 13000vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch thu cạn (bước này thực hiện 2 lần).
- (7) Làm khô mẫu trong box bật quạt 5 phút, hòa tan cạn bằng 50 μl nước khử ion có DEPC và DNase, bảo quản mẫu ở -86°C.

2.2.2.6. Xác định sự phiên mã của gen chuyển GmDREB6 trong cây chuyển gen

Sự biểu hiện của gen *GmDREB6* ở mức phiên mã được phân tích bằng phản ứng RT-PCR với cặp mồi XbaI-DREB6-F/DREB6-SacI-R. Phản ứng RT-PCR được thực hiện qua hai giai đoạn:

(1) Giai đoạn RT: Đây là giai đoạn tổng hợp cDNA từ mRNA. Phản ứng được thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất Fermentas. Tổng hợp cDNA từ 1,5 µg RNA theo hướng dẫn của bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit [156].

Bước 1: Trộn hỗn hợp gồm 3µl RNA, 1µl môi Oligo(dT)₁₈, 8µl nước khử ion khử DEPC, li tâm nhanh mẫu, ủ ở 65°C trong 5 phút.

Bước 2: Bổ sung 2 µl dung dịch đệm cho enzyme phiên mã ngược, 1µl dNTPs, 1µl Inhibitor, li tâm nhanh mẫu, đặt mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

Bước 3: Bổ sung 1µl reverse transcriptase. Sau đó đặt mẫu vào máy PCR với chu trình nhiệt 42°C trong 1 giờ và 70°C trong 10 phút.

(2) Giai đoạn PCR: cDNA được sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen *GmDREB6*. Thành phần của phản ứng được trình bày trong bảng 2.3. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gen *GmDREB6* là 94°C/3 phút 30 giây; (94°C/30 giây; 58°C/50 giây; 72°C/1 phút 20 giây) lặp lại 30 chu kỳ; 72°C/10 phút; 4°C: ∞.

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

2.2.3.1. Phương pháp xử lý và phân tích khả năng chịu mặn của cây chuyển gen

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 in vitro* được huấn luyện và đưa ra trồng trong chậu có kích thước 115 x 85 x 105 mm chứa hỗn hợp phân trộn Tribat, bao gồm đất hữu cơ, đất phù sa, hỗn hợp xốp, than hoạt tính và vi sinh vật. 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.

2.2.3.2. 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 theo đơn đặt hàng với Công ty Phù Sa (Việt Nam) 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.

Phản ứng qRT-PCR được thực hiện với thể tích 20 µl gồm các thành phần như sau: 10 µl SYBR Premix Ex Taq II; 0,75 µl của mồi xuôi (F) 10 mM; 0,75 µl mồi ngược (R) 10 mM; 7,5 µl nước khử ion không có DNase và 1,0 µl cDNA. Thông tin về các mồi được sử dụng trong phản ứng qRT-PCR được trình bày ở bảng 2.5.

Bảng 2.5. Trình tự nucleotide của các cặp mồi được sử dụng trong phản ứng Realtime RT-PCR

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Nhiệt độ tiếp hợp mồi (°C)
<i>GmDREB6-F/</i>	ATGGTCATGGAAGAATCTAACCCA	58
<i>GmDREB6-R</i>	TTAATTATGATTCCCATAGA	58
<i>ActNF/ ActNR</i>	GATCTTGCTGGTCGTGATCTT	58
	GTCTCCAACCTCTTGCTCATAGTC	60
<i>qRT-DREB-F/</i>	TAATGAAGGCAAGCACCTAC	60
<i>qRT-DREB6-R</i>	CGTCGGCTAATTCTGGGAAA	60
<i>qRT-P5CS-F/</i>	TGCTCGTGAGATGGCAGTTGC	60
<i>qRT-P5CS-R</i>	AGCCTGTTGAGCAGCAACCAC	60
<i>qRT-CLC-F/</i>	CTTGGAGGCCTTCTCGGAAGC	60
<i>qRT-CLC-R</i>	AGCCTACAGGACATGGTGTGC	60

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). Các phản ứng được lặp lại 3 lần. 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 $-\Delta\Delta C_t$ của Livak được sử dụng để phân tích dữ liệu biểu hiện gen [76].

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

2.2.4.1. Phương pháp biến nạp cấu trúc vector mang gen chuyển *GmDREB6* vào giống đậu tương DT22 thông qua *A. tumefaciens*

Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *A. tumefaciens* lây nhiễm qua nách lá mầm được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Olhoft và cs (2006) [97] và Nguyễn Thu Hiền và cs (2014) [3]. Quy trình cụ thể như sau:

Tạo nguyên liệu biến nạp: Hạt đậu tương sau khi khử trùng bằng khí clo từ hỗn hợp 100 ml javen + 3 ml HCl đậm đặc được nuôi cấy và nảy mầm trên môi trường RM (Bảng 2.6). Sau 5 ngày, lá mầm được tách đôi và loại bỏ đỉnh sinh trưởng để sử dụng làm nguyên liệu nhận gen và nuôi cấy *in vitro*.

Vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* được nuôi trong môi trường LB lỏng có kháng sinh chọn lọc, sau đó nuôi phục hồi trong LB lỏng không kháng sinh, li tâm thu dịch. Tạo dịch huyền phù *A. tumefaciens* trong môi trường ½ MS.

Thành phần của các môi trường được dùng trong nghiên cứu này như môi trường mầm, đồng nuôi cấy, cảm ứng tạo chồi, kéo dài chồi và tạo cây đậu tương chuyển gen *in vitro* hoàn chỉnh ở giống đậu tương DT22 được thể hiện ở bảng 2.6. Các môi trường đều sử dụng MS cơ bản là chế phẩm pha sẵn ở dạng bột hỗn hợp có đầy đủ dinh dưỡng, khoáng cần thiết.

Lây nhiễm và đồng nuôi cấy: Gây tổn thương các mảnh lá mầm đậu tương bằng mũi dao và kim nhọn ở phần nách lá mầm. Các mảnh lá mầm đã tổn thương được ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens* mang vector *pBI121_GmDREB6* trong thời gian 30 phút. Sau đó, các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc, không kháng sinh. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25°C trong thời gian 3 ngày.

Bảng 2.6. Môi trường nảy mầm, đồng nuôi cấy, cảm ứng tạo chồi, tái sinh cây chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22

Môi trường	Thành phần
Hạt nảy mầm (germination medium -GM)	MS 4,3 g/l + Muối B5 3,052 g/l + sucrose 20 g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung vitamin B5 1000X 1ml/l.
Đồng nuôi cấy (co-cultivation medium- CCM)	MS 4,3 g/l + Muối B5 0,316g/l + MES 3,9 g/l + Sucrose 30 g/l + agar 6 g/l có bổ sung acetosyringone 0,04 g/l + vitamin B5 1000X 1ml/l + BAP 1,67 mg/l + GA3 0,25mg/l, pH = 5,4.
Tạo đa chồi (shoot induction medium-SIM)	MS 4,3g/l + Muối B5 3,052g/l + MES 0,59g/l + sucrose 30 g/l + agar 8g/l, pH = 5,8, bổ sung BAP 1,67 mg/l + cefotaxim 500mg/l + vitamin B5 1000X 1ml/l + kanamycin 50 mg/l (lần 1) và kanamycin 75 mg/l (lần 2).
Kéo dài chồi (shoot elongation medium-SEM)	MS 4,3 g/l + MES 0,59g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 200ml/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8; bổ sung cefotaxim 500mg/l + vitamin B5 1000X 1ml/l + GA3 500mg/l + IAA 100mg/l + L-asparagine monohydrate 50mg/l + kanamycin 50 mg/l.
Ra rễ (rooting medium-RM)	MS 4,3 g/l + sucrose 20 g/l + MES 0,59g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxim 250mg/l + IBA 0,1mg/l + vitamin B5 1000X 1ml/l + L-asparagine monohydrate 50mg/l + kanamycin 50 mg/l.

Cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM: Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được rửa trong môi trường cảm ứng tạo chồi SIM, bổ sung cefotaxim 500 mg/l với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Đặt mẫu lên môi trường tạo chồi SIM 1, bổ sung cefotaxim 500

mg/l và kanamycin 50 mg/l (lần 1). Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM 2 đặc, bổ sung cefotaxim 500 mg/l và kanamycin 75 mg/l (lần 2).

Kéo dài chồi: Sau 3 tuần, các cụm chồi sống sót trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh được loại bỏ lá mầm và chuyển sang môi trường phát triển kéo dài chồi (SEM), bổ sung cefotaxim 500 mg/l và kanamycin 50 mg/l.

Tạo rễ và cây hoàn chỉnh: Khi các chồi phát triển đạt kích thước từ 3 – 4cm sẽ được chuyển sang môi trường tạo rễ RM, bổ sung cefotaxim 250 mg/l và kanamycin 50 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh.

Cây ra giá thể: Những cây khoẻ mạnh, có bộ rễ phát triển được đưa ra bầu trên giá thể có tỷ lệ 2 đất thịt: 1 trấu hun : 2 xơ dừa. Sau khoảng 2 tuần, các cây sống sót được đưa trồng trong nhà lưới.

2.2.4.2. Xác định sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trong cây đậu tương chuyển gen

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây đậu tương chuyển gen theo Saghai-Marooof và cs (1984) [103]. Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R* [93] để xác định sự có mặt của gen *GmDREB6* trong cây chuyển gen (Bảng 2.2). Đoạn DNA được nhân bản dự kiến có kích thước là 741 bp. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0%.

RNA tổng số được tách chiết từ lá cây đậu tương chuyển gen và cây WT theo quy trình mục 2.2.2.5. Chất lượng của RNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và đo quang phổ hấp thụ trên máy Nano Drop. Dịch chiết RNA tổng số có chất lượng tốt được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng Bộ Kit cDNA RevertAid First Strand (Thermo Scientific, Hoa Kỳ).

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 và 2.2.2.6 với các môi PCR đặc hiệu được trình bày ở bảng 2.2 và bảng 2.4.

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Các số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS theo phương pháp thống kê sinh học ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05; 0,01$ và $0,001$.

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 10/2019 đến tháng 4/2021.

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 CÂY ĐẬU TƯƠNG

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

Trong hệ gen cây đậu tương, hai nhóm gen chi phối khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học, đó là nhóm gen mà sản phẩm của mỗi gen liên quan trực tiếp đến tính chống chịu (gen chức năng), nhóm gen thứ hai có vai trò điều hòa nhóm gen chức năng (gen điều hòa). Nhóm gen *DREB* trong hệ gen đậu tương được mô tả là có phản ứng với các stress phi sinh học ở mức phiên mã. Các nhân tố phiên mã *DREB* tham gia vào quá trình phản ứng với stress phi sinh học như hạn, mặn, lạnh, nóng... Đến nay, một số gen *GmDREB* đã được xác định có trong hệ gen đậu tương, như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5* [102]. Một số gen *GmDREB* đã được tách dòng từ đậu tương, phân tích biểu hiện và các sản phẩm dịch mã của các gen *GmDREB* này được khẳng định tham gia vào quá trình kháng hạn và kháng mặn [33], [92], [101]. Vấn đề đặt ra là trong hệ gen đậu tương có bao nhiêu thành viên thuộc phân họ gen *DREB* và những gen *GmDREB* nào chưa được nghiên cứu cần làm rõ chức năng? Cách tiếp cận phân tích dữ liệu gen *GmDREB* bằng công cụ Tin sinh học đã cung cấp thông tin về số lượng gen và một số thành viên của phân họ *DREB* trong hệ gen đậu tương còn chưa rõ chức năng cần được nghiên cứu và chứng minh bằng thực nghiệm. Dữ liệu gen và sự khai thác các gen *GmDREB* trên toàn bộ hệ gen đậu tương không những cung cấp cơ sở cho phân tích tiến hóa phân tử mà còn tạo cơ sở cho nghiên cứu tìm kiếm chức năng sinh học của một số gen *GmDREB* liên quan đến khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học của cây đậu tương.

Nghiên cứu này trình bày kết quả xác định và phân tích sự tiến hóa của các thành viên trong phân họ gen *DREB* ở đậu tương nhằm tạo cơ sở cho thực nghiệm chứng minh chức năng gen *GmDREB* và ứng dụng vào việc cải thiện tính chống chịu các stress phi sinh học.

Khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI [152] đã xác định được 41 gen *DREB* của đậu tương, phân tích mở rộng những bản copy gen *DREB* và những trình tự gen *GmDREB* đã phân lập từ một số giống đậu tương Việt Nam đã xác định 69 trình tự gen *GmDREB* khác nhau trên GenBank (Phụ lục 1).

Phang và cs (2008) cho rằng có hơn 10 gen *DREB* trong hệ gen đậu tương [102]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi xác định được 18 gen *GmDREB* có trong hệ gen đậu tương (Phụ lục 1). Từ các kết quả nghiên cứu chức năng gen *DREB* rất có thể sẽ phát hiện thêm các gen *GmDREB* mới và các bản copy của chúng. Trong kết quả này, các gen *GmDREB* có từ 1 đến 8 copy (Bảng 3.1) phân bố trên 17 nhiễm sắc thể, tại các nhiễm sắc thể số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20. Gen *GmDREB3* có 8 copy phân bố trên các nhiễm sắc thể 1, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 17; hai gen *GmDREB1F* và *GmDREB2F* có 4 copy; gen *GmDREB1E* có 3 copy; các gen còn lại có từ 1- 2 copy.

Trong số 18 gen *GmDREB* ở bảng 3.1, một số gen đã được làm rõ chức năng, như gen *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB6*. *GmDREB1* có chức năng tăng cường khả năng chịu nóng, hạn và lạnh [63], *GmDREB2* được xác nhận làm tăng khả năng chịu hạn, chịu muối của cây chuyển gen [29], [33], [130], *GmDREB3* đã làm tăng cường khả năng chịu lạnh, hạn và muối ở cây *Arabidopsis* biến đổi gen [30], *GmDREB5* liên quan đến khả năng chịu muối [105]. Tăng cường biểu hiện gen *GmDREB6* đã làm tăng sự tích

lũy proline và khả năng chịu muối của cây đậu tương biến đổi gen đã được bào cáo [55].

Mặc dù đã xác định được chức năng của số ít gen *DREB* của đậu tương, nhưng một số thành viên của phân họ gen *DREB* ở đậu tương chưa rõ chức năng chống chịu các stress phi sinh học cần tiếp tục nghiên cứu làm sáng tỏ.

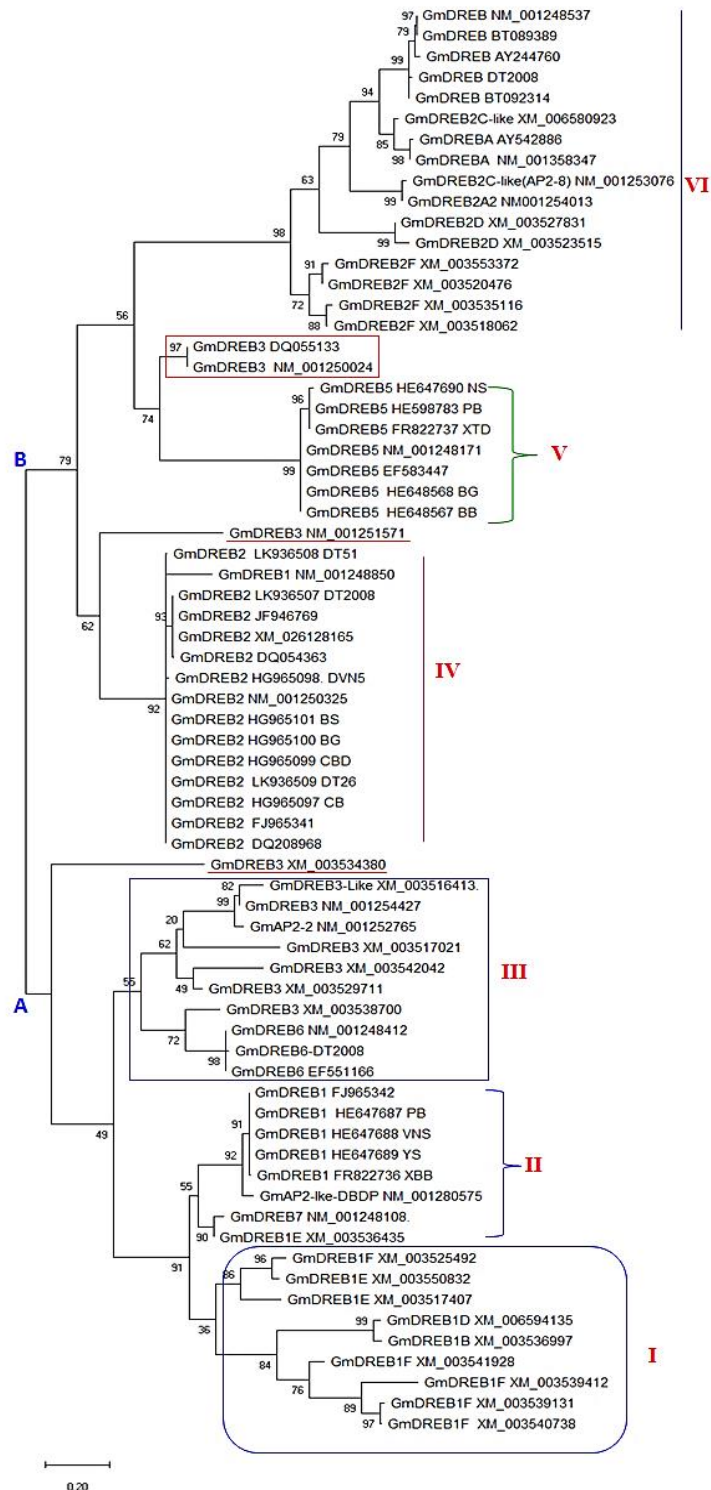
Bảng 3.1. Số bản copy và vị trí của mỗi gen *GmDREB* trong hệ gen cây đậu tương

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

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

Kết quả phân tích sự phát sinh gen thuộc phân họ *DREB* ở hình 3.1 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. 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 tự *GmDREB3* phân bố ở những nhánh riêng trong sơ đồ cây. Trình tự *GmDREB3* mang mã số XM_003534380 là một nhánh phụ của nhánh A, *GmDREB3* (NM_001251571) là một nhánh tách riêng khỏi nhóm IV, hai gen *GmDREB3* (DQ055133 và NM_001250024) phân bố trong một nhánh, tách khỏi nhóm IV. Gen *GmDREB3* có 8 copy trên các nhiễm sắc thể khác nhau (Bảng 2), trong đó gen *GmDREB3* (XM_003534380) có vị trí trên nhiễm sắc thể số 9, *GmDREB3* (NM_001251571) trên nhiễm sắc thể 17 và *GmDREB3* (DQ055133 và NM_001250024) trên nhiễm sắc thể số 4 (Phụ lục 1). Trong quá trình tiến hóa, các nhiễm sắc thể khác nhau có tốc độ đột biến phân tử khác nhau, cho nên có thể các bản copy của gen *GmDREB3* đã dần tách xa nhau trong cây phát sinh của phân họ gen *DREB* ở đậu tương.



Hình 3.1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa giữa các thành viên của phân họ gen *DREB* ở đậu tương được thiết lập dựa trên các trình tự gen *GmDREB* theo phương pháp Maximum Likelihood và JTT matrix-based model trong MEGAX.

Đặc điểm của miền AP2 trong phân họ DREB ở đậu tương

Trên hình 3.2 thể hiện sự khác nhau cơ bản về trình tự amino acid miền AP2 ở protein DREB suy diễn từ 18 gen *GmDREB* của đậu tương. Sự sai khác giữa các trình tự amino acid miền AP2 biểu hiện ở thành phần và số lượng amino acid. Miền AP2 trong các protein thuộc phân họ nhân tố phiên mã DREB phổ biến từ 59-60 amino acid, tuy nhiên một số protein DREB chứa miền AP2 có tới 62 amino acid (DREB5), có 63 (DREBA), có 53 amino acid (DREB3-like), hoặc chỉ có 43 amino acid (DREB2C-like) (Hình 3.2).

Motif PTPEMAARAYDVAAALALKGPSARLNFPEL của miền AP2 có ở tất cả các protein DREB của đậu tương. Miền AP2 của các thành viên trong phân họ protein DREB có các điểm liên kết với promoter của gen chức năng mà nhân tố phiên mã DREB kích hoạt phiên mã. Kết quả so sánh ở bảng 3.2 cho thấy trong miền AP2 của 18 protein DREB ở đậu tương đều có 11 amino acid liên kết với sợi DNA ở vùng promoter (DNA binding site) với 4 dạng và phổ biến là RGRRWKERRWT, tìm thấy ở 13/18 protein DREB. Ngoài ra còn hai dạng KGRRNKERRWT và KGRRWKERRWT (có ở 2/18 protein DREB) và dạng RGRRTKERRWT chỉ có ở một loại protein DREB (Bảng 3.2).

3.1.3. Cây phát sinh miền AP2 ở đậu tương

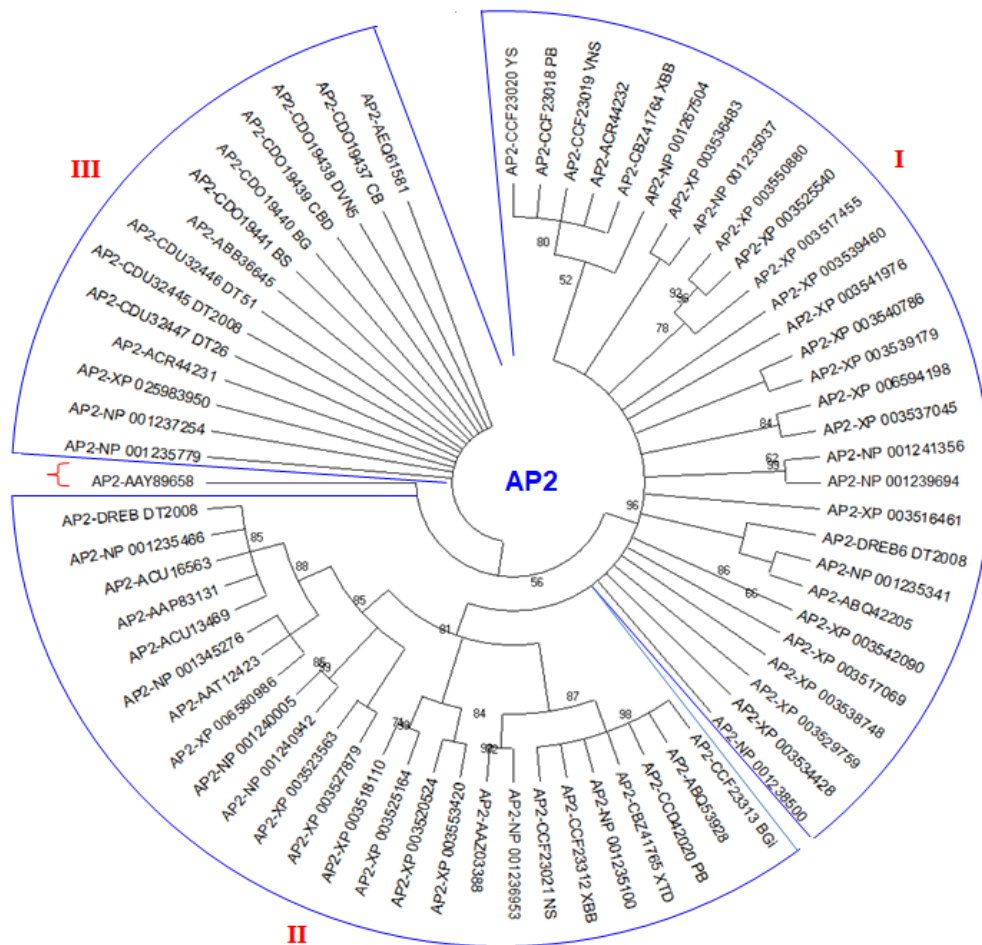
Phân tích tiến hóa của phân họ protein DREB dựa trên trình tự amino acid của miền AP2 trong 69 protein DREB của cây đậu tương bằng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình JTT matrix-based trong MEGAX [65]. Sơ đồ cây được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid của miền AP2 theo tỷ lệ và chiều dài nhánh được đo bằng số lần thay thế trên mỗi vị trí amino acid. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã được loại bỏ. Bộ dữ liệu cuối cùng có tổng cộng 38 vị trí amino acid.

	10	20	30	40	50	60					
AP2-AAP83131	NYR	GVRQRTW	GKQVAEIREP	NRGN-RLWL	GFPTAIGAAL	AYDEAAQAMY	GSCARLNFPN	-----			
AP2-AAT12423				S-		S.....	M...F...	VQVS-			
AP2-AY89658		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVT..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-AAZ03388			H.		L. KNRT-.....	..D..EE..	..K..YKLR	DF.....LR---			
AP2-ABB36645		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-ABQ42205		M.Q.		S.....	RKKS-.I.		PDM..R	H.V..LTIK	..S.Y....E	L----	
AP2-ABQ53928			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKLR	EN.....E	LFLNK		
AP2-ACR44231		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-ACR44232		R.NS	D...C.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-ACU13469										----	
AP2-ACU16563										----	
AP2-AEQ61581		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CBZ41764_XBB		R.NS	D...C.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-CBZ41765_XTD			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKQR	EN.....E	LFFNK		
AP2-CCD42020_PB			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKQR	EN.....E	LFFNK		
AP2-CCF23018_PB		R.NS	D...C.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-CCF23019_VNS		R.NS	D...C.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-CCF23020_YS		R.NS	D...C.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-CCF23021_NS		W.H.		L. RNRT-.....	..D..EDT.M	..RE.FKQR	EN.....E	LFFNK			
AP2-CCF23312_XBB			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKLR	EN.....E	LFLNK		
AP2-CCF23313_BG1			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKLR	EN.....E	LFLNK		
AP2-CDO19437_CB		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDO19438_DVN5		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDO19439_CBD		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDO19440_BG		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDO19441_BS		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDU32445_DT2008		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDU32446_DT51		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-CDU32447_DT26		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-DREB DT2008										----	
AP2-DREB6 DT2008		M.Q.	C.S.		RKKS-.I.	R		PDM..R	H.V..LTIK	..S.Y....V	L----
AP2-NP_001235037		R.DS	C.V.		KKS-.I.		EM..R	H.V..I.LR	RS.C...AD	S----	
AP2-NP_001235100			H.		L. RNRT-.....	..D..ED..M	..RE.FKLR	EN.....E	LFLNK		
AP2-NP_001235341		M.Q.		S.....	RKKS-.I.		PDM..R	H.V..LTIK	..S.Y....E	L----	
AP2-NP_001235466										----	
AP2-NP_001235779		I.M.K.		KRS-.I.	SYT.PVA..R	..T.VFYLR	PT.....E	LL---			
AP2-NP_001236953			H.		L. KNRT-.....	..D..EE..	..K..YKLR	DF.....LR---			
AP2-NP_001237254		I.M.K.		KRS-.I.	SYA.PVA..R	..T.VFHRLR	PS.....E	LL---			
AP2-NP_001238500		K..K.K.		S..L. SRQ-.I.	SYD.PEK..R	F.A.MFCLR	RN.KF..D	NPPD-			
AP2-NP_001239694		M.N.		S. RKKs-.I.		PEM..R	H.V..LSIK	PA.I...H	LANS-		
AP2-NP_001240005			G.		S-.....	SS.QE..				----	
AP2-NP_001240942			G.		S-.....	SS.QE..		R...P.		----	
AP2-NP_001241356		M.N.		S. RKKs-.I.		PEM..R	H.V..LSIK	A.I...H		----	
AP2-NP_001267504		R.NT	D...S.V...	KKT-.I.		PEM..R	H.V..M.LR	RY.C...AD	S----		
AP2-NP_001345276				S-.....						----	
AP2-NP_003516461		M.N.		S. WKKs-.I.		PEM.VW	HNV..LSIK	A.I...H		----	
AP2-NP_003517069		M.		S. RKK-.I.		A.EM..R	H.V..LTIK	S.I...E	L----		
AP2-NP_003517455		R.NK	N..C.M.V.	NNS-.I.		Y..PEM..R	H.V..L.LR	KS.C...AD	S----		
AP2-NP_003518110				KKRT-.....	S.A..EE..		RRL.	PD.Y..L.H		----	
AP2-NP_003520524				KKRT-.....	S.A..EE..M		RRL.	PD.Y..L.H	LQP-		
AP2-NP_003523563		K.			A-.....	E.SHE..	A.RKL.	D.K..L.E	LS---		
AP2-NP_003525164				KKRT-.....	S.A..EE..		RRL.	PD.Y..L.		----	
AP2-NP_003525540		R.NN	N..C.V.V.	DKST-.I.		Y.VPEM..R	H.V..L.LR	KS.C...AD	S----		
AP2-NP_003527879		K.		A-.....		E.SHE..	A.RKL.	D.K..L.E	LS---		
AP2-NP_003529759		H..K.N.		S. RKKs-.I.		S.PEM..R	H.V..LTIK	QS.I...E		----	
AP2-NP_003534428		F..K.S.	RY.S..L.	GQKT-.I.		S.GSPEM..R	..S..FFLK	TS.T...		----	
AP2-NP_003536483		R.DS	C.V.		KKS-.I.		EM..R	H.V..L.LR	RS.C...AD	S----	
AP2-NP_003537045		K.		NG N..S.L.Q.	NK.A.V.		HPDM..I	V..L.FK	DS.S...	----	
AP2-NP_003538748		M.K.		S. KKKs-.I.		S.S.PEM..R	H.V..LTIK	TS.F...E	L----		
AP2-NP_003539179			NG N..C.		IKKS-.V.V.	Y..PEM..R	H.V..VL.LS	TS.KF..D	S----		
AP2-NP_003539460		I.		KG N..C.L.	KKTT-.I.	Y..PEM..R	H.VG.L.IR	TS.I...S	----		
AP2-NP_003540786			NR N..C.		IKKS-.I.V.	Y..PEM..R	H.V..VL.LS	TS.NF..D	S----		
AP2-NP_003541976			NG N..C.V.		KKS-.I.	Y..SPEM..R	H.V..VL.LK	TS.VF..D	S----		
AP2-NP_003542090		H..M.N.		S. RKKs-.I.		A.PEM..R	H.V..LSIK	HT.V....	IVN-		

Hình 3.2. So sánh trình tự amino acid miền AP2 của các protein trong phân họ DREB ở đậu tương

Bảng 3.2. So sánh các điểm liên kết trong miền AP2 với sợi DNA vùng promoter của 18 thành viên trong phân họ nhân tố phiên mã DREB ở cây đậu tương

STT	Tên gen	Các dạng amino acid liên kết với sợi DNA của promoter (DNA binding site)
1	<i>GmDREB</i>	RGRRWKERRWT
2	<i>GmDREB1</i>	RGRRWKERRWT
3	<i>GmDREB1E</i>	RGRRWKERRWT
4	<i>GmDREB1F</i>	RGRRWKERRWT
5	<i>GmDREB2</i>	RGRRWKERRWT
6	<i>GmDREB2A2</i>	RGRRWKERRWT
7	<i>GmDREB2C</i>	RGRRWKERRWT
8	<i>GmDREB3</i>	RGRRWKERRWT
9	<i>GmDREB5</i>	RGRRWKERRWT
10	<i>GmDREB6</i>	RGRRWKERRWT
11	<i>GmDREBa</i>	RGRRWKERRWT
12	<i>GmAP2-2</i>	RGRRWKERRWT
13	<i>GmDREB7</i>	RGRRWKERRWT
14	<i>GmAP2-Ile</i>	RGRRTKERRWT
15	<i>GmDREB1B</i>	KGRRNKERRWT
16	<i>GmDREB1D</i>	KGRRNKERRWT
17	<i>GmDREB2D</i>	KGRRWKERRWT
18	<i>GmDREB2F</i>	KGRRWKERRWT



Hình 3.3. Cây phát sinh miền AP2 của phân họ protein DREB ở đậu tương được thiết lập dựa trên 69 trình tự amino acid miền AP2 theo phương pháp Maximum Likelihood trong MEGAX [65] và JTT matrix-based model với bootstrap được lặp lại 1000 lần.

Kết quả phân tích sự tiến hóa miền AP2 của protein DREB ở đậu tương bằng phần mềm MEGAX [65] cho thấy cây phát sinh thiết lập từ 69 trình tự amino acid 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).

Như vậy, có 18 gen *GmDREB* trong hệ gen đậu tương đã được xác định và các bản copy phân bố trên 17 nhiễm sắc thể, trong đó *GmDREB3* có 8 copy, còn lại các gen *GmDREB* khác có 1- 4 copy. Nghiên cứu này đã cung cấp thông tin toàn diện về phân họ gen *DREB*, tạo cơ sở cho các phân tích thực nghiệm tiếp theo để làm rõ chức năng của một số thành viên trong phân họ gen *DREB* trong hệ gen đậu tương.

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 (Liu và cs 2007) [75], gen *GmDREB6* nhân tạo được thiết kế với kích thước 741 bp (Hình 3.4). 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 cmyc, tổng cộng là 741 nucleotide. Gen *GmDREB6* được chèn vào vector pUC18 (*pUC18_GmDREB6*).

5' gctctagaATGGTCATGGAAGAATCTAACCCATTAGACAATGAAGTTCAACCAACCACTT
 CATCATCCTCTTTCACCATTACTACTCCCTCTACCTCCTCTTCTCCTCCATAGAAGAAGC
 CACTAACACTACAAAGGAGAAAAAGAAGAAAGCCAATAGTAATGAAGGCAAGCACCCCTACG
 TATAGAGGAGTTTCGCATGCGTCAATGGGGCAAATGGGTATCCGAAATTAGAGAGCCAAGGA
 AGAAATCAAGAATTTGGCTTGGTACTTTTCCCACGCCCGATATGGCGGCTCGAGCCCATGA
 CGTGGCGGCTCTCACGATCAAAGGCAGCTCGGCTTACCTCAATTTCCCAGAATTAGCCGAC
 GAGCTGCCCCGCCCGCCAGCACCTCCCCCAAGGACATCCAAGCTGCGGCGTCTAAAGCCG
 CTGCCTTGGATTTTCGGCCACCGAAGCCATGACGCCGAGTCCGAGCTGAGCCGAGCCGTTTC
 CTCCTCAATCCTCACACAAGCATCATCATCATCCAATTCATCATCGTTGAAGGGTGTG
 GATGACACATTCTTGGACCTTCCTGATCTCTCTCTCGACTTGAGCCATGGAGCCGATGAGT
 TTCATTATTCGTCAGCTTGGCTTGTAGCCGGAGCCGAACATATAGAGCTGGGTTTTTCGGCT
 TGAGGATCCTTTTCTATGGGAATCATATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT
 TAAgagctcg 3'

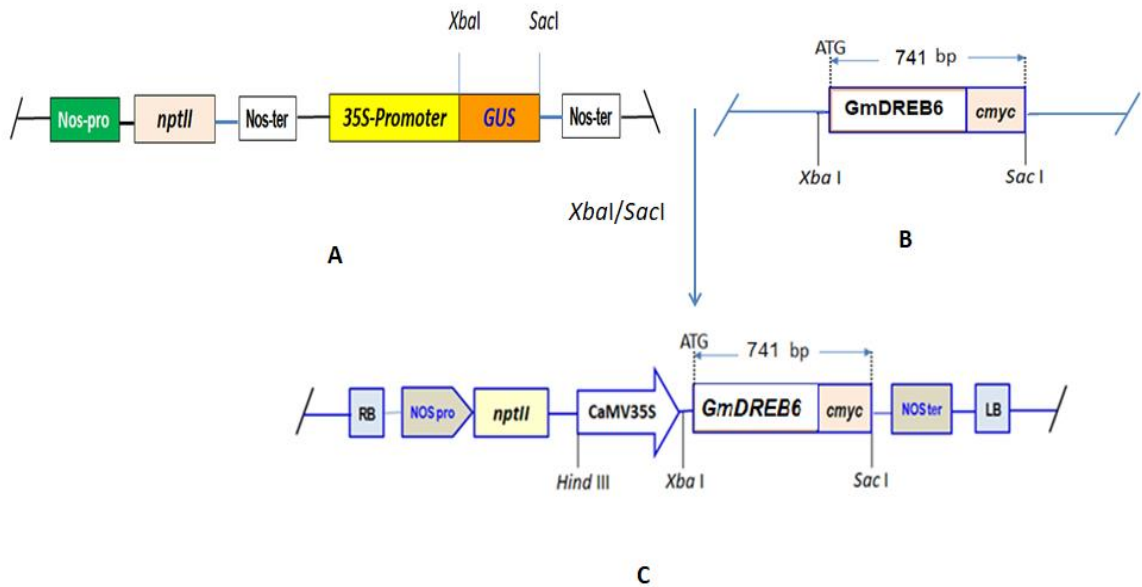
Hình 3.4. Trình tự nucleotide của gen *GmDREB6* nhân tạo.

Đầu 5'- gctctaga là trình tự chứa vị trí cắt của XbaI và đầu gagctcg – 3' là trình tự chứa vị trí cắt của enzyme SacI.

Trên hình 3.4, gen *GmDREB6* được cấu trúc bởi vùng mã hóa gồm 693 bp, bổ sung 8 bp (5'-gctctaga) ở đầu 5' (vị trí cắt của *XbaI*) và 7 bp (gagctcg-3') ở đầu 3' (vị trí cắt của enzyme *SacI*). Một đoạn 33 bp mã hóa peptid kháng nguyên c-myc ở đầu 3' đã được thêm vào so với trình tự *GmDREB6* có mã EF551166 trên GenBank, trình tự *GmDREB6* nhân tạo có G thay thế bằng T ở vị trí 417.

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* (Hình 3.5A) sau đó chèn gen chuyển *GmDREB6* vào vector chuyển gen *pBI121*, tạo ra cấu trúc mang gen chuyển *pBI121_GmDREB6* (Hình 3.5C).



Hình 3.5. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*

A: Vector *pBI121_GUS*; B: Vector *pUC18_GmDREB6*; C: *pBI121_GmDREB6*;

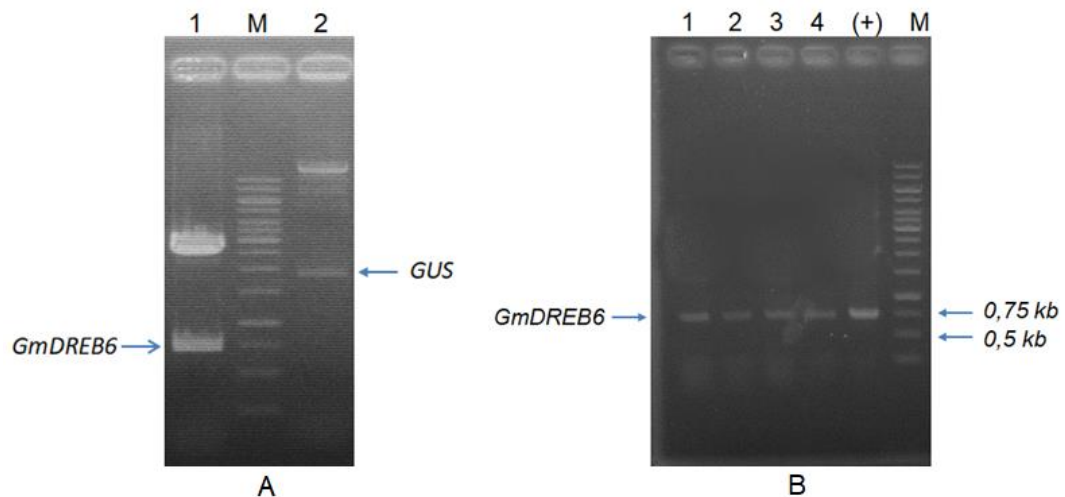
nptII: neomycin-phospho-transferase II; 35S: Virus khảm súp lơ 35S Promoter;

GmDREB6-cmc: Gen *GmDREB6* chứa *cmc* và vị trí cắt của cặp enzyme *XbaI/SacI*

Kết quả cắt vector *pUC18_GmDREB6* bằng cặp enzyme giới hạn *XbaI/SacI* thu được gen *GmDREB6* (Hình 3.6A), đồng thời cắt vector *pBI121_GUS* cũng bằng cặp enzyme giới hạn *XbaI/SacI* đã loại bỏ được gen *GUS* (Hình 3.6B). Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* được biến nạp vào *E.coli* DH5 α , được nhân bản và kiểm tra bằng colony-PCR (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 thu được một băng DNA ứng với kích thước của gen chuyển *GmDREB6* (Hình 3.7). Các khuẩn lạc

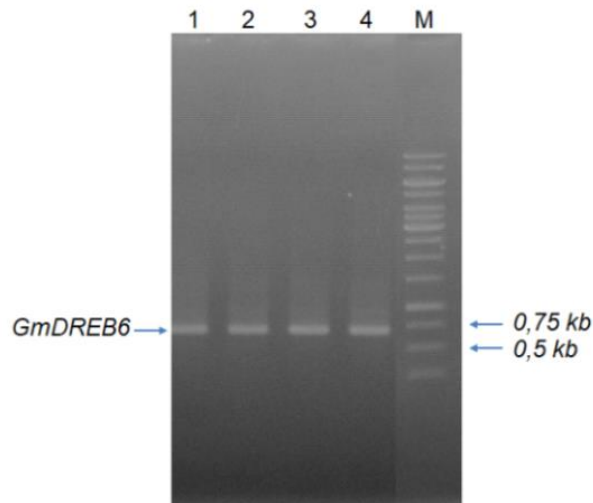
A.tumefaciens dương tính được lưu giữ và sử dụng để lây nhiễm vào thuốc lá và đậu tương để tạo cây chuyển gen.



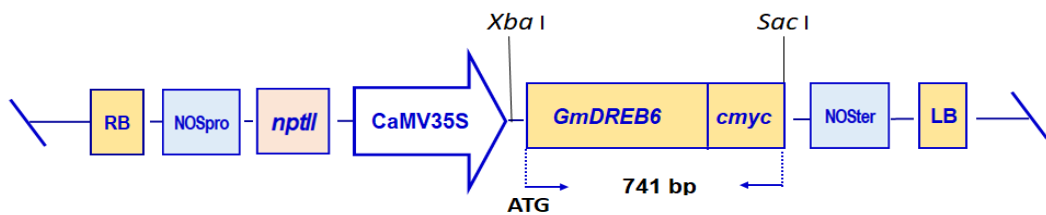
Hình 3.6. A- Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt từ vector *pUC18_GmDREB6*, *pBI121_GUS* bằng cặp enzyme *SacI/XbaI*; 1: *pUC18_GmDREB6*; M: Thang DNA 1kb; 2: *pBI121_GUS*.

B- Hình ảnh điện di kiểm tra gen *GmDREB6* trong cấu trúc *pBI121_GmDREB6* từ khuẩn lạc *E.coli DH5α* tái tổ hợp *E.coli DH5α* 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 DH5α*.

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. Dòng khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 tái tổ hợp được sử dụng trong biến nạp vào cây thuốc lá và cây đậu tương.



Hình 3.7. 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.



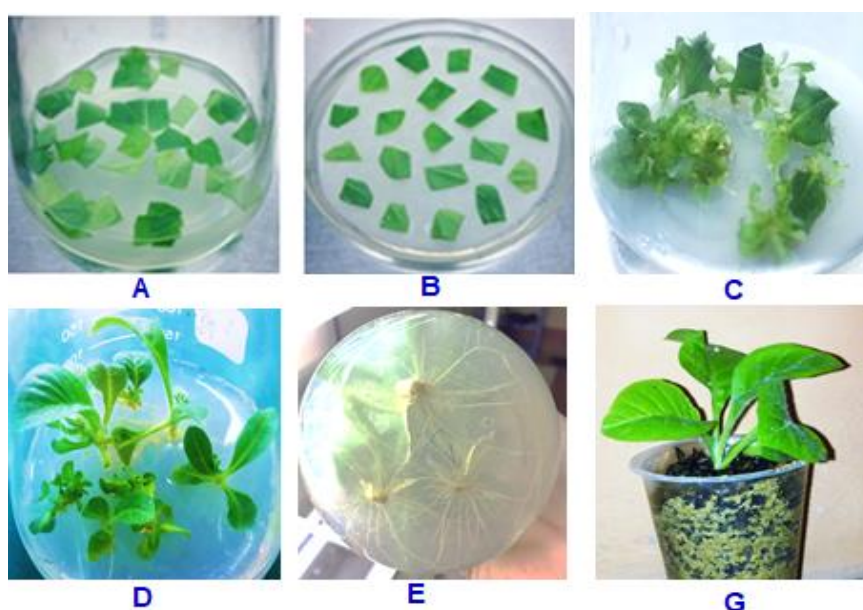
Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector *pBI121_GmDREB6* được sử dụng để chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* [93].

LB và *RB*: bờ trái và bờ phải của *T-DNA*; *nptII*: neomycin-phosphotransferase II; *CaMV35S*: promoter 35S của virus khảm súp lơ;

GmDREB6_cmc: Gen *DREB6* của đậu tương được gắn một trình tự nucleotide mã hóa peptide *cmc*; *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 mô cây 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 cây trong tối. Các mẫu này tiếp tục được rửa sạch khuẩn bằng kháng sinh cefotaxime 500 mg/ml và thấm khô trên giấy thấm vô trùng. Chúng tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường tái sinh đa chồi, môi trường ra rễ để tạo ra cây thuốc lá chuyển gen (Hình 3.9).



Hình 3.9. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* và tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*.

A: Các mảnh lá ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens*; **B:** Các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cây; **C, D:** Tái sinh đa chồi và kéo dài chồi; **E :** Các chồi sống sót sau chọn lọc được chuyển sang môi trường tạo rễ; **G:** Cây thuốc lá chuyển gen được trồng trên giá thể.

Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* vào cây thuốc lá được trình bày ở bảng 3.3. Bảng 3.3 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 có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin, trong đó có 309 chồi

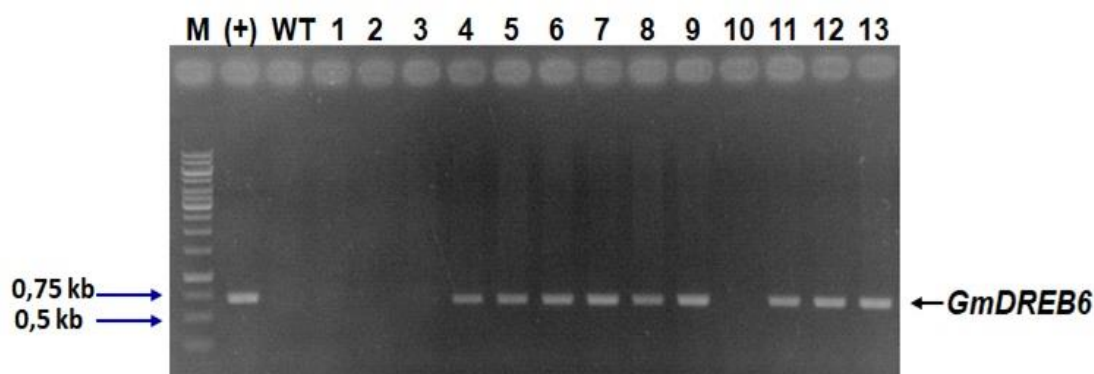
sinh trưởng tốt chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả có 101 cây con đã được trồng trên chậu, trong đó 48 cây được chuyển đến nhà lưới chăm sóc.

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 thu được 9 cây dương tính với sự xuất hiện của một băng DNA có cùng kích thước với gen chuyển *GmDREB6* (741 bp) (Hình 3.10). Cây chuyển gen dương tính PCR trong thể hệ T0 được ký hiệu là T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13.

Bảng 3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc pBI121-*GmDREB6* vào mô cây thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu	Số mẫu tạo cụm chồi	Số chồi được tái sinh	Số cây ra rễ	Số cây chuyển sang trồng trong chậu	Số cây chuyển sang trồng trong nhà lưới
ĐC0*		30	23	85	63	20	10
ĐC1*		30	0	0	0	0	0
Thí nghiệm	Lần 1	60	42	165	65	34	13
	Lần 2	60	39	158	72	31	17
	Lần 3	60	51	216	69	36	18
Tổng thí nghiệm		180	132	539	309	101	48

Ghi chú: ĐC0: Mẫu lá thuốc lá không biến nạp được cây trên môi trường tái sinh không có kháng sinh; ĐC1*: Mẫu lá thuốc lá không biến nạp được cây trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh.*

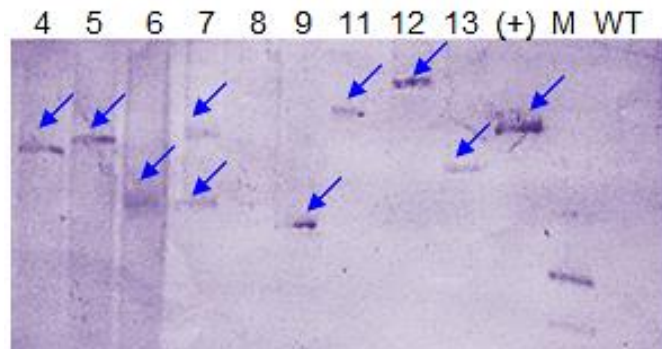


Hình 3.10. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển *GmDREB6* từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.

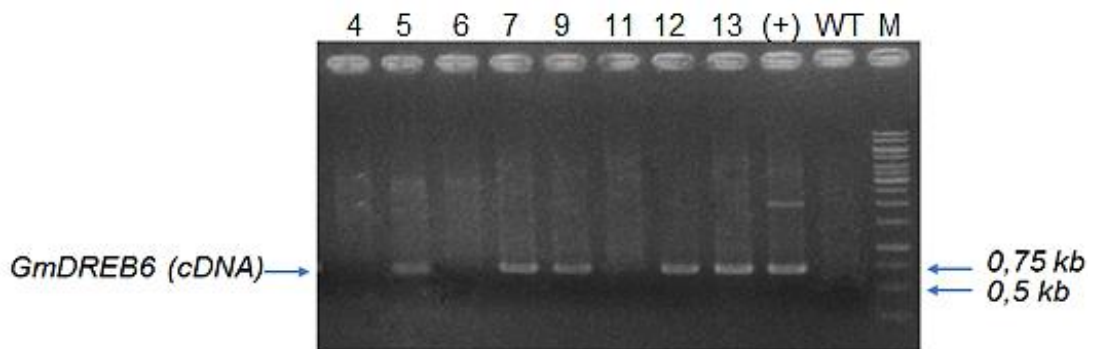
M: thang DNA 1 kb; (+): plasmid *pBI121-GmDREB6*; *WT*: cây không biến nạp; 1-13: Các cây chuyển gen thế hệ T0 (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-9, T0-11, T0-12, T0-13).

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 thể hiện ở hình 3.11. Hình 3.11 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. Trong các cây cho kết quả lai Southern, cây T0-7 có hai bản copy, còn lại các cây chuyển gen T0 đều có một bản copy. 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.

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 3.12). Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* đã được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen.



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)



Hình 3.12. Hình ảnh kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR khuếch đại cDNA của gen chuyển *GmDREB6* từ mRNA của các cây chuyển gen thế hệ T0. *M*: thang DNA 1 kb; (+): plasmid pBI121-*GmDREB6*; WT: Cây không biến nạp; Các làn điện di 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13: 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.

Cấu trúc 35S-*GmDREB6*-*cmcy* 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. Như vậy, có thể thấy vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* hoạt động tốt trên các cây thuốc lá mô hình. Do đó, cấu trúc mang gen *GmDREB6* có thể sử dụng để chuyển vào cây đậu tương như mục tiêu là tạo cây chuyển gen có khả năng chống chịu các stress phi sinh học.

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

Ảnh hưởng của stress muối có thể được quan sát thấy ở cấp độ tế bào, cơ quan và toàn bộ cây trồng. Các quá trình sinh học trong tế bào chịu tác động rất lớn, như sự cân bằng thẩm thấu bị phá vỡ, giảm hiệu suất tổng hợp protein, quang hợp và các quá trình chuyển hóa khác. Khả năng chống lại stress do muối của thực vật liên quan đến các quá trình sinh lý phức tạp, các con đường trao đổi chất và sự biểu hiện của các gen liên quan. Một số gen đậu tương đã được mô tả là có khả năng đáp ứng với các căng thẳng phi sinh học như, gen mã hóa yếu tố phiên mã DREB kích hoạt phiên mã nhóm gen chức năng; gen *P5CS* mã hóa enzyme chìa khóa trong quá trình sinh tổng hợp proline; gen *CLC* có chức năng làm tăng sự vận chuyển Cl^- từ tế bào chất vào không bào và nâng cao khả năng chống chịu NaCl, Nghiên cứu này tiếp cận phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB6* từ đậu tương và làm rõ mối liên quan giữa sự biểu hiện gen *GmDREB6* và mức độ phiên mã của gen *NtP5CS* và *NtCLC* trên cây thuốc lá trong điều kiện stress mặn.

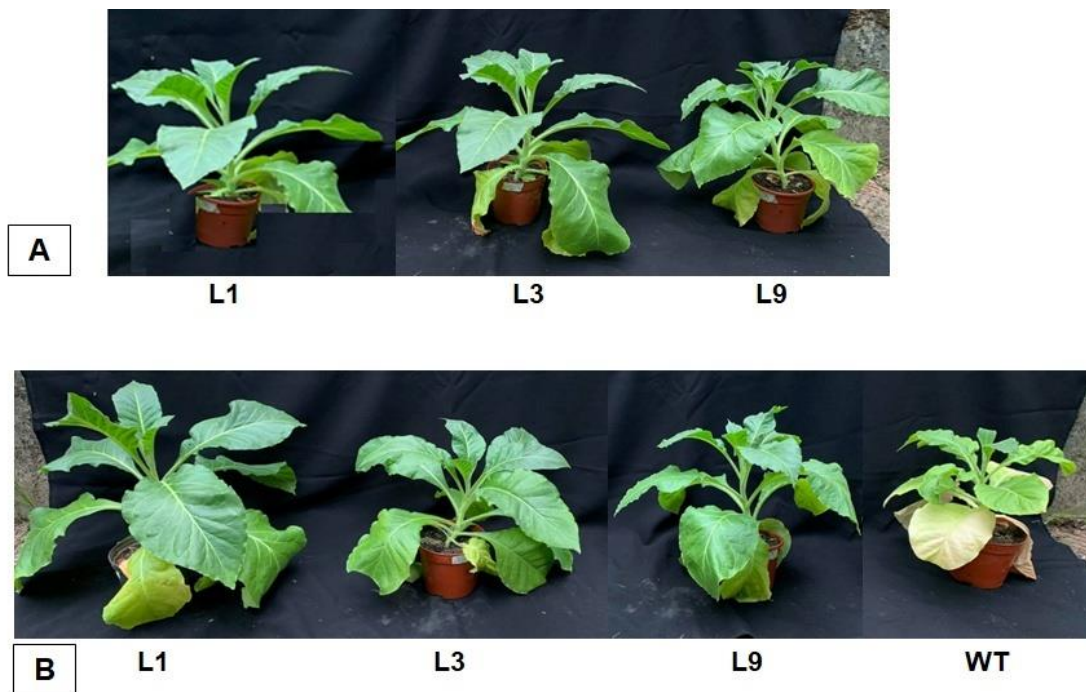
3.3.1. Xử lý mặn các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* và cây WT

Trong 5 cây T0 (T0-5, T0-7, T0-9, T0-12, T0-13) cho kết quả phiên mã tổng hợp mRNA, chọn 3 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.

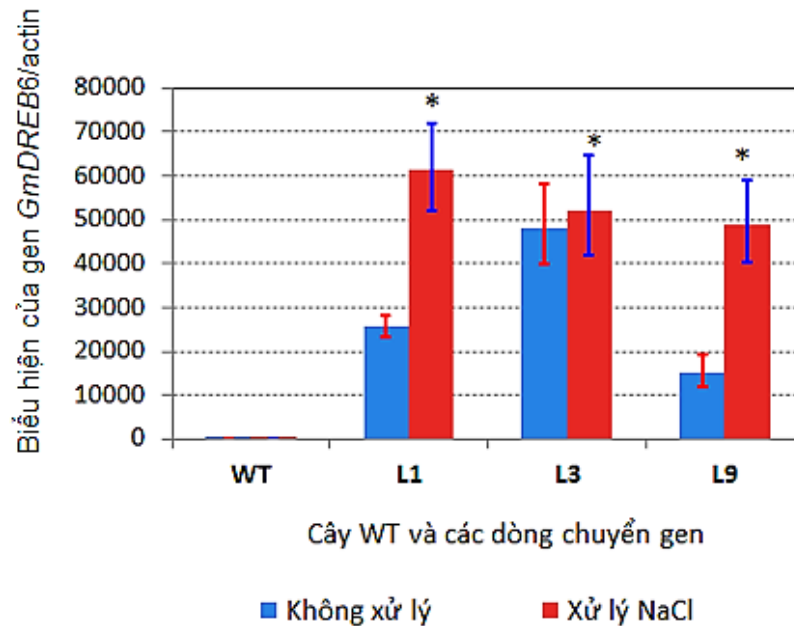
3.3.2. Phân tích mức độ biểu hiện của các gen *GmDREB6*, *NtP5CS* và *NtCLC* phản ứng với stress mặn ở các dòng thuốc lá chuyển gen

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* của các dòng cây chuyển gen được biểu hiện quá mức trong khi không quan sát thấy sự biểu hiện ở cây WT. Kết quả này xác nhận rằng gen chuyển *GmDREB6* đã được hợp nhất vào hệ gen của cây thuốc lá và quá trình phiên mã của gen *GmDREB6* đã được thực hiện. 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 3.13. 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.



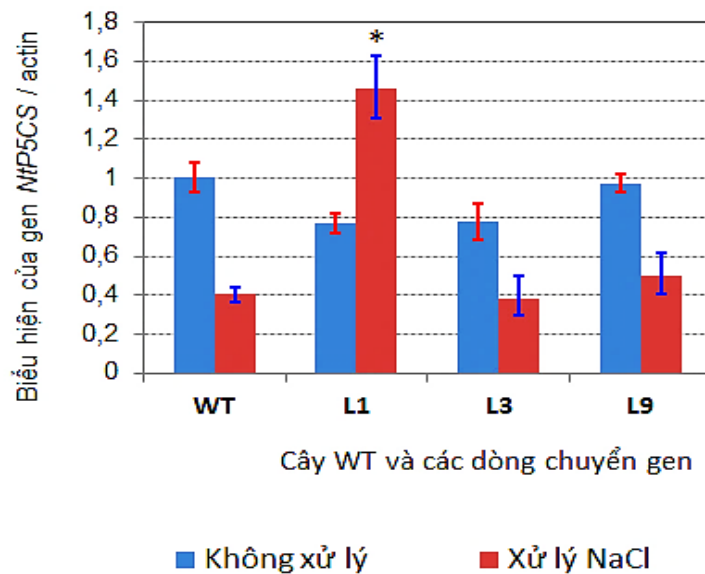
Hình 3.14. Mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6* ở các dòng thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn bằng phản ứng qRT-PCR sử dụng *Actin* làm gen tham chiếu.

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 ($P < 0,05$).

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.

Trong điều kiện stress muối, gen *P5CS* mã hóa enzyme P5CS và gen *CLC* mã hóa protein vận chuyển Cl^- trong không bào cũng đã được chứng minh là có vai trò trong việc tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng [135], [138], [145]. Trong nghiên cứu này, đối với gen *NtP5CS* của cây thuốc lá chuyển gen (gen nội sinh), kết quả trên hình 3.14 cho thấy, trong điều kiện tưới nước bình thường (không xử lý NaCl), không có sự khác biệt về mức độ

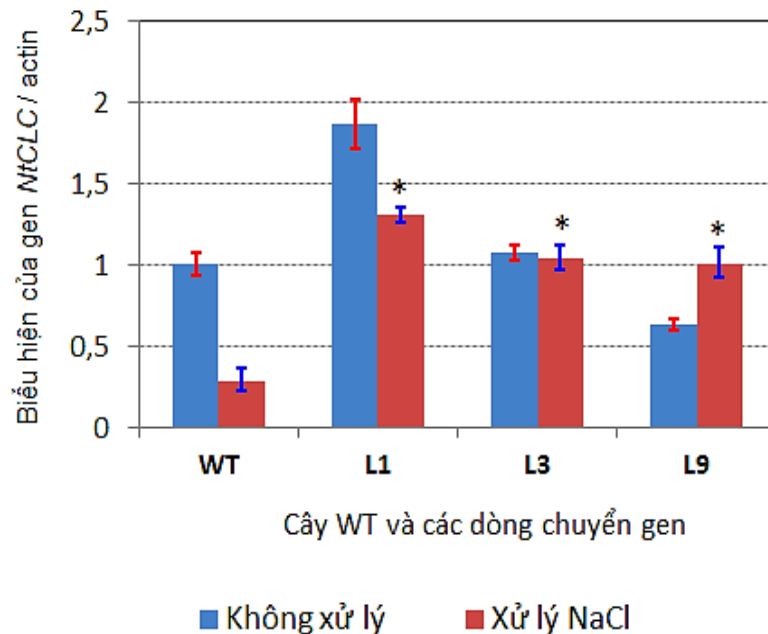
phiên mã giữa các dòng thuốc lá chuyển gen so với cây WT. Tuy nhiên, trong điều kiện stress mặn, ở các dòng chuyển gen L1 và L9 có mức độ phiên mã của gen *P5CS* tăng từ 1,24 đến 3,60 (lần) so với ở cây WT. Trong số 3 dòng thuốc lá chuyển gen, dòng L1 có mức phiên mã của gen *P5CS* tăng 1,9 lần so với dòng L1 không xử lý, trong khi dòng L3 và L9 không cho thấy sự thay đổi biểu hiện này (Hình 3.15).



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 ($P < 0,05$).

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

Nước biển xâm thực vào đất liền gây nhiễm mặn đất trồng ngày càng gia tăng ở nhiều quốc gia ven biển, trong đó có Việt Nam, do đó, cải tiến cây trồng theo hướng tăng khả năng chống chịu mặn là mối quan tâm đặc biệt hiện nay. Việc tăng cường sự biểu hiện gen mã hóa nhân tố phiên mã được thực hiện để đánh giá tác động lên các gen có chức năng chống chịu các stress phi sinh học. DREB thuộc họ nhân tố phiên mã AP2/ERF có thể liên kết với các yếu tố DRE / CRT trong vùng promoter của một số lượng lớn các gen liên quan sự phản ứng các stress phi sinh học ở thực vật. Trong những năm gần

đây, đã có nhiều tiến bộ đáng kể trong việc làm rõ vai trò điều tiết của DREB trong phản ứng của cây trồng đối với các stress phi sinh học. Gen *DREB* được đưa vào một số cây trồng chuyển gen đã thể hiện tăng cường khả năng chống chịu đối với nhiều loại stress phi sinh học [62]. Các nghiên cứu trước đây cũng 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 [62], [83], [113]. *GmDREB6* trong phân họ gen *DREB* của đậu tương đã được chứng minh là làm tăng tích lũy proline và nâng cao khả năng chống chịu mặn ở đậu tương biến đổi gen [92]. 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 [101].

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 [73]. 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) [146] và như vậy nhân tố phiên mã

GmDREB6 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.

Proline là chất thẩm thấu, hàm lượng proline cao trong tế bào sẽ làm tăng khả năng giữ nước của tế bào. Trong cây thuốc lá và thực vật nói chung có 2 loại enzyme quan trọng là *P5CS* và *P5CR* tham gia vào quá trình tổng hợp proline trong tế bào. Sự biểu hiện quá mức của gen *NtP5CS* (gen nội sinh trong cây thuốc lá) sẽ làm tăng hàm lượng enzyme P5CS trong tế bào thuốc lá, tăng tổng hợp và tích lũy proline, đồng thời dẫn đến tăng áp suất thẩm thấu, do đó làm tăng khả năng giữ nước của cây [143]. Protein chloride channel (CLC) là anion chất mang quan trọng tồn tại trong vi khuẩn, nấm men, thực vật và động vật [127]. 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 [148]. 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 [72].

Khi khảo sát mức độ phiên mã của gen nội sinh *NtP5CS* và *NtCLC* trong cây thuốc lá chuyển gen và cây WT, chúng tôi nhận thấy các dòng thuốc lá chuyển gen L1 có sự biểu hiện gen *NtP5CS* tăng đáng kể so với cây WT và so với hai dòng chuyển gen L3 và L9. Đồng thời, dòng chuyển gen L1 cũng được chứng minh là có sự biểu hiện của gen *NtCLC* tăng lên so với cây WT.

Trong khi các dòng thuốc lá chuyển gen L3 và L9 chỉ ghi nhận các phản ứng tăng cường biểu hiện gen *NtCLC* trong điều kiện stress muối, thì dòng chuyển gen L1 đã ghi nhận các cải tiến trong sự biểu hiện đồng thời của gen chuyển *GmDREB6*, *NtP5CS* và *NtCLC* của cây thuốc lá chuyển gen (Hình 3.14, 3.15, 3.16). Những kết quả này cho thấy vai trò của gen *GmDREB6* từ đậu tương và mối quan hệ của nó với sự biểu hiện của gen *NtP5CS* và *NtCLC* ở thuốc lá. Kết quả phân tích vai trò gen *GmDREB6* cho thấy khả năng chống chịu với stress mặn ở cây trồng có thể được cải thiện bằng cách kiểm soát sự biểu hiện của gen *DREB*. Tuy nhiên, đánh giá thêm vai trò của gen *GmDREB6* là cần thiết để xác định mối liên quan giữa nhân tố phiên mã *DREB6* với các gen chức năng khác đáp ứng với stress mặn.

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 QUA *A.tumefaciens* Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

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

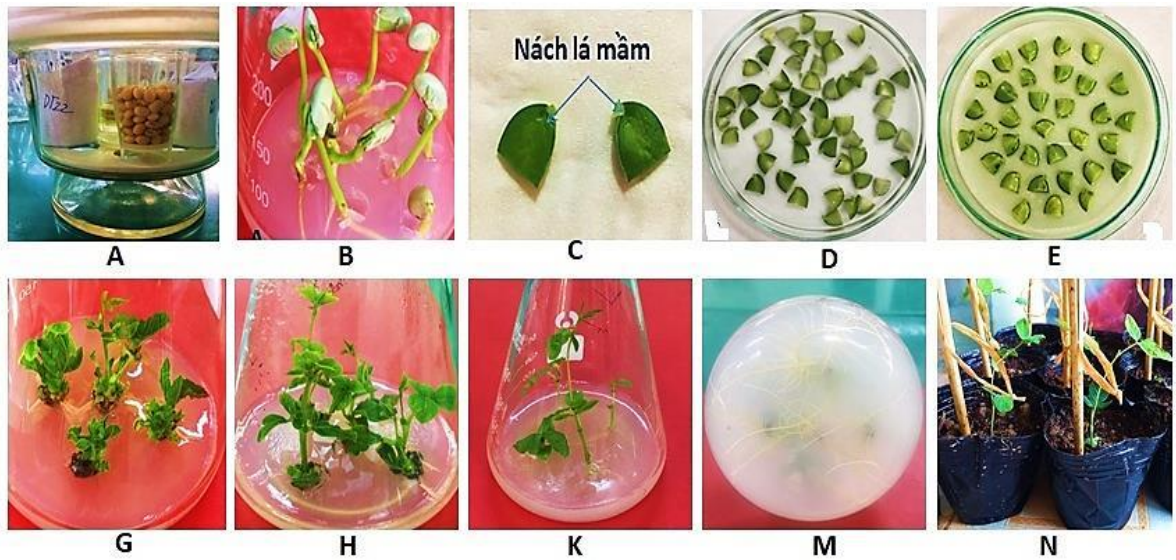
Đậu tương là cây thực phẩm quan trọng mang lại nhiều giá trị về kinh tế, dinh dưỡng và cải tạo đất, nhưng thuộc nhóm cây chống chịu kém các yếu tố bất lợi phi sinh học, như hạn, mặn, nóng, lạnh,... Nhiều cách tiếp cận nghiên cứu cải thiện khả năng chống chịu của cây đậu tương đã được thực hiện và mang lại kết quả khả quan, trong đó có kỹ thuật biểu hiện mạnh gen mã hóa nhân tố phiên mã và gen *GmDREB6* là một lựa chọn.

Giống đậu tương ĐT22 được trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam, có thời gian sinh trưởng ngắn và có khả năng kháng bệnh phân trắng, tuy nhiên, giống đậu tương ĐT22 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 [1]. Trong nghiên cứu này, giống đậu tương Việt Nam ĐT22 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.

Hạt của giống đậu tương ĐT22 được khử trùng và cho nảy mầm trên môi trường GM để thu lá mầm làm nguyên liệu biến nạp. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* thông qua lây nhiễm *A.tumefaciens* qua nách lá mầm được thể hiện ở hình 3.17 và bảng 3.4.

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy các mẫu đối chứng không chuyển gen (ĐC1) không có khả năng tạo chồi trong môi trường chứa kháng sinh chọn lọc kanamycin; còn trong môi trường không chứa kháng sinh, lô ĐC0 đã có 21/30 mẫu tạo chồi với 53 chồi, trong đó có 42 được chuyển sang môi trường kéo dài và 34 chồi ra rễ trên môi trường RM. Chuyển 30 cây trồng trên giá thể và kết quả có 11 cây sống trong điều kiện nhà lưới.

Trong lô thí nghiệm, với 450 mẫu biến nạp, lặp lại 3 lần đã có 185 mẫu tạo chồi và tổng số chồi được tạo thành là 583 chồi. Chuyển 174 chồi sang môi trường SEM, kết quả chọn lọc bằng kháng sinh thu 152 chồi sinh trưởng phát triển tốt. Các chồi đã qua chọn lọc bằng kháng sinh được nhân lên để tạo các dòng chuyển gen T0 và 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 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 xơ dừa trong nhà lưới.

Bảng 3.4. Kết quả biến nạp gen *GmDREB6* vào giống đậu tương ĐT22

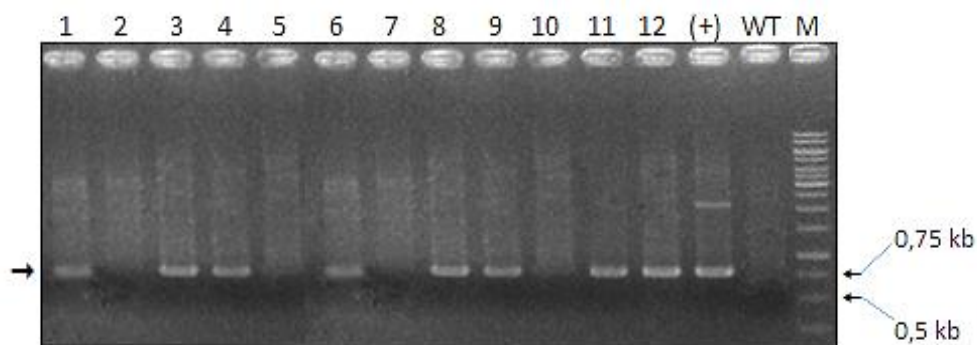
Đối chứng và thí nghiệm	Tổng số mẫu	Số mẫu tạo chồi	Tổng số chồi trên môi trường SIM	Số chồi chuyển sang môi trường SEM	Số chồi ra rễ trên môi trường RM	Số cây tròn g trên giá thể	Số cây sống sót và phát triển bình thường trong nhà lưới
ĐC0	30	21	53	42	34	30	11
ĐC1	30	0	0	0	0	0	0
Lần 1	150	65	208	62	45	17	4
Thí 1							
nghiệ Lần 1	150	51	173	41	19	15	3
m 2							
chuyển Lần 1	150	69	202	71	45	21	5
gen 3							
Tổng	450	185	583	174	109	53	12

Ghi chú: ĐC0: mảnh lá mầm đậu tương không biến nạp được cấy trên môi trường tái sinh không chứa kháng sinh; ĐC1: mảnh lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh.

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

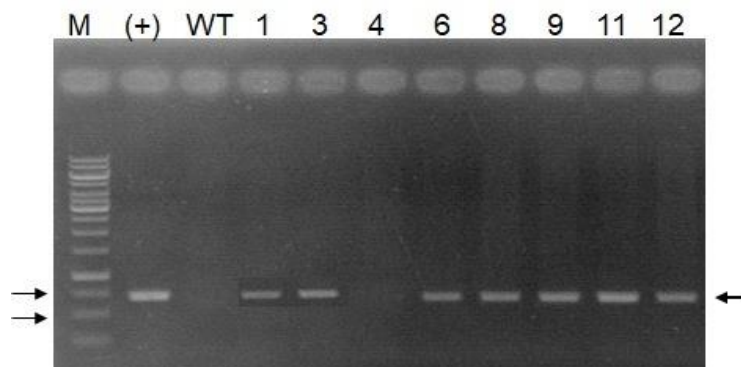
Lá các dòng cây đậu tương biến nạp ở thế hệ T0 trong nhà lưới được sử dụng để phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen. DNA tổng số tách từ lá non của 12 cây T0 được sử dụng cho phân tích PCR với cặp mồi *GmDREB6_XbaI-F/GmDREB6_c-myc-SacI-R*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn DNA *GmDREB6_c-myc* được thể hiện ở hình 3.18.

Kết quả phân tích điện di ở hình 3.18 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. Như vậy, bước đầu có thể xác nhận gen chuyển *GmDREB6* đã hiện diện trong hệ gen của 8 dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0, ký hiệu là T0-1, T0-3, T0-4, T0-6; T0-8, T0-9, T0-11, T0-12.



Hình 3.18. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen chuyển *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; 1-12: các dòng cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6*.

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. Trên 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 cây 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 được công bố bởi nhiều tác giả. Việc gây tổn thương nách lá mầm cần phải có các thao tác kỹ thuật phù hợp thì mới tạo đủ mô đích cho sự xâm nhiễm của vi khuẩn [97], [138]. Tuy nhiên, mức độ hình thành chồi ở nách lá mầm không những phụ thuộc vào kỹ thuật gây tổn thương mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của kiểu gen cây đậu

tương [98]. Ở Việt Nam, Trần Thị Cúc Hòa (2007) [4], Nguyễn Thị Thúy Hường (2011) [5], Nguyễn Thu Hiền (2011) [3], Lò Thị Mai Thu (2014) [12], Lò Thanh Sơn (2015) [11], Nguyen HQ và cs (2019) [92], Phạm và cs (2020) [101], 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 DT22 với số chồi tái sinh đạt trung bình 3,15 chồi/mẫu. Kết quả 3 lần chọn lọc bằng kháng sinh kanamycin ở các giai đoạn tạo chồi, kéo dài chồi và ra rễ, 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 3.18). Đồng thời, kết quả phân tích RT-PCR đã xác định được gen chuyển *GmDREB6* đã biểu hiện ở 7 cây đậu tương T0 .

Ở Việt Nam, hiệu suất chuyển gen ở đậu tương ở giai đoạn phân tích PCR đã được báo cáo. Hiệu suất chuyển gen *P5CSm* vào giống đậu tương DT84 đạt 0,24% [5], chuyển gen HA1 vào giống DT12 đạt 1,23% [3], biến nạp cấu trúc RNAi vào giống DT12 là 1,35%, vào giống DT2008 là 2,24% [11], chuyển gen *GmEXP1* vào giống DT84 đạt 0,53% [11], chuyển gen *GmDREB2* vào giống DT84 đạt 2,64% [101], chuyển gen *GmCHI* vào giống DT2008 đạt 2,05% [92]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hiệu suất chuyển gen *GmDREB6* ở giai đoạn phân tích PCR đạt 1,78% và giai đoạn phân tích RT-PCR đạt 1,56%. Như vậy, có thể thấy rằng hiệu suất chuyển gen gián tiếp nhờ *A.tumefaciens* ở cây đậu tương không chỉ phụ thuộc vào đặc điểm kiểu gen và khả năng tiếp nhận gen của giống, mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của cấu trúc gen được chuyển vào cây đậu tương.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. 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 583 chồi từ

450 mẫu biến nạp. Sau 3 lần chọn lọc bằng kanamycin đã thu được 53 cây được trồng trên giá thể và 12 cây sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới. Phân tích phân tử các dòng chuyển gen *GmDREB6* ở thế 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

Trong số 18 gen *GmDREB* có trong hệ gen đậu tương còn nhiều gen chưa có thông tin về chức năng cần được tiếp tục nghiên cứu để làm rõ bằng thực nghiệm.

Tiếp tục phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp của 7 dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* có kết quả phân tích RT-PCR ở các thế hệ T0, T1, T2 để chọn tạo được dòng đậu tương có sự sinh trưởng, phát triển bình thường và khả năng chịu mặn cao.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tan Quang Tu, Phutthakone Vaciauxa, 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*; In Press. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.018>.
2. Phutthakone Vaciauxa, 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 Vaciauxa, 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 Vaciauxa, 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Đăng Minh Chánh, Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Trang, Phạm Thị Xuân, Quách Ngọc Truyền (2017), “Đánh giá khả năng chịu mặn của một số giống đậu tương phổ biến tại Việt Nam, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 74 (1), tr. 60-66.
2. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào (1999), *Cây đậu tương*, Nxb Nông Nghiệp.
3. Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn (2010), “Nghiên cứu khả năng tái sinh và biến nạp gen qua rách lá mầm của 2 giống đậu tương (*Glycine max* L. Merrill), DT12 và DT84 bằng *Agrobacterium*”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(3B), tr. 1305-1310.
4. Tran T.C.H. (2007), “Research on the transgenic response-ability of soybean varieties grown in Vietnam”, *Vietnamese Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 18, pp. 11-16.
5. Nguyễn Thị Thuý Hường (2011), *Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Đại học Thái Nguyên.
6. Nguyễn Thị Thuý Hường, Trần Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2009), "Phát triển hệ thống tái sinh in vitro ở cây đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) phục vụ chuyển gen", *Tạp chí khoa học&Công nghệ- Đại học Thái Nguyên*, vol. 52 (4), pp. 89- 93.

7. Nguyễn Thị Thuý Hương, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Hữu Cường, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2010), “Tạo cây thuốc lá chuyển gen P5CS đột biến loại bỏ hiệu ứng phản hồi ngược, làm tăng hàm lượng proline và khả năng chống chịu khô hạn”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8 (3A), tr. 539-544.
8. Trần Thị Phương Liên (2010), *Protein và tính chống chịu ở thực vật*, Nxb Khoa học tự nhiên và công nghệ, 346 trang.
9. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thuý Hương, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Hà (2011), *Gen và Đặc tính chống chịu của cây đậu tương*. Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
10. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Nguyễn Thị Minh Hồng, Hoàng Văn Mạnh (2011), “Đặc điểm của gen *DREB1* phân lập từ giống đậu tương địa phương (*Glycine max* L. Merrill), Xanh lờ Ba Bể -Bắc Kạn”, *Tạp chí Sinh học*, tập 33(1), tr. 52-59.
11. Lò Thanh Sơn (2015), *Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen GmEXP1 liên quan đến sự phát triển bộ rễ của cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Đại học Thái Nguyên.
12. Lò Thị Mai Thu, Lê Hồng Trang, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2014), "Nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen kháng soybean mosaic virus và bean yellow mosaic virus", *Tạp chí khoa học&Công nghệ- Đại học Thái Nguyên*, 115 (2), tr.111-115.
13. 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 DT2008”, *Tạp chí Khoa học&Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 187(11), tr. 163 – 168.

Tiếng Anh

14. Abel G.H. (1969), “Inheritance of the capacity for chloride inclusion and exclusion in soybeans”, *Crop Sci.*, 9, pp. 697-699.
15. Agarwal P., Agarwal P.K., Joshi A.J., Sopory S.K., Reddy M.K. (2010), “Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes”, *Molecular Biology Reports*, 37, pp. 1125–1135.
16. Agarwal P., Agarwal P.K., Nair S., Sopory S.K., Reddy M.K. (2007), “Stress inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA binding activity”, *Molecular Genetics and Genomics*, 277, pp. 189–198.
17. Agarwal P.K., Agarwal P., Reddy M.K., Sopory SK (2006), “Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants”, *Plant Cell Rep*, 25, pp. 1263-1274.
18. Ahmad P., Ahanger M.A., Alam P., Alyemeni M.N., Wijaya L., Ali S., Ashraf M. (2019), “Silicon (si) supplementation alleviates nacl toxicity in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] through the modifications of physio-biochemical attributes and key antioxidant enzymes”, *J. Plant Growth Reg.*, 38(1), pp. 70-82. DOI 10.1007/s00344-018-9810-2.
19. Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010), “Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress”, *Crit Rev Biotechnol*, 30, pp. 161-175.
20. Almoguera C., Prieto-Dapena P., Dí 'az-Martín J., Espinosa J.M., Carranco R., Jordano J. (2009), “The HaDREB2 transcription factor

- enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9”, *BMC Plant Biology*, 9, pp. 75.
21. Behnam B., Kikuchi A., Celebi-Toprak F., Yamanaka S., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Watanabe K.N. (2006), “The *Arabidopsis DREB1A* gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*)”, *Plant Biotechnology*, 23, pp. 169–177.
 22. Bhaskar Gupta, Bingru Huang (2014), “Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization”, *International Journal of Genomics*, Article ID 701596, 18 pages; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.
 23. Bhatnagar-Mathur P., Devi M.J., Reddy D.S., Vadez V., YamaguchiShinozaki K., Sharma K.K. (2006), “Over-expression of *Arabidopsis thaliana DREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) for improving tolerance to drought stress (poster presentation). In: Sackler AM, ed. 2006 Colloquia on ‘From functional genomics of model organisms to crop plants for global health’”, *Washington: DC. National Academy of Sciences*, pp. 3–5.
 24. Bihani P., Char B., Bhargava S. (2011), “Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation”, *Journal of Agricultural Science*, 149, pp. 95–101.
 25. Chen L.L., Qu R.D., Dekochko A., Fauquet C. (1993), “An improved rice transformation system using the biolostic method”, *Plant Cell Reports*, 12(5), pp. 250-255.

26. Chen J., Dong Y., Wang Y., Liu Q., Zhang J., Chen S. (2003), "An AP2/ EREBP-type transcription-factor gene from rice is cold-inducible and encodes a nuclear-localized protein", *Theoretical and Applied Genetics*, 107, pp. 972–979.
27. Chen J., Xia X., Yin W. (2009), "Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, pp. 483–487.
28. Chen J.Q., Meng X.P., Zhang Y., Xia M., Wang X.P. (2008), "Overexpression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice", *Biotechnology Letters*, 30, pp. 2191–2198.
29. Chen M., Wang Q.Y., Cheng X.G., Xu Z.S., Li L.C., Ye X.G., Xia L.Q., Ma Y.Z. (2007), "GmDREB2 a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, pp. 299-305.
30. Chen M., Xu Z., Xia L., Li L., Cheng X., Dong J., Wang Q., Ma Y. (2009), "Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.)", *Journal of Experimental Botany*, 60, pp. 121–135.
31. Chen H., Liu X., Zhang H., Yuan X., Gu H., Cui X., Chen X. (2018), "Advances in salinity tolerance of soybean: Genetic diversity, heredity, and gene identification contribute to improving salinity tolerance", *Journal of Integrative Agriculture*, 17, pp. 2215-2221.
32. Claes H.A., Dix P.J. (1990), *Culture systems and selection procedures*, In: *Plant Cell Line Seletion*, P.J., Dix (ed.), VCH Verlagsgesellschaft.

33. Dao Xuan Tan, Ho Manh Tuong, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son, Chu Hoang Mau (2015), "Cloning and Overexpression of *GmDREB2* Gene from a Vietnamese Drought-resistant Soybean Variety", *Braz. Arch. Biol. Technol*, 58(5), pp. 651-657 (SCI-E).
34. De Ronde J. A., Cress W.A., Krüger G.H.J., Strasser R.J., Van Staden J.(2004), "Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress", *J Plant Physiol* 161(11), pp.1211-24.doi: 10.1016/j.jplph.2004.01.014.
35. Diasz-Martins J., Almoguera C., Prieto P.D, Espinosa J.M., Jordano J. (2005), "Functional interaction between two transcription factors involved in the developmental regulation of a small heat stress protein gene promoter", *plant physiol*, 139, pp. 1483-1494.
36. Diédhiou C.J. and Golldack D. (2006), "Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice", *Plant Sci.* 170, pp. 793-800.
37. Do T.D., Vuong T.D., Dunn D. (2019), "Identification of new loci for salt tolerance in soybean by high-resolution genome-wide association mapping", *BMC Genomics.*, 20, pp. 318.<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5662-9>
38. Dodd J.D., Coupland R.T.(1996), "Osmotic pressure of native plants of saline soil in Saskatchewan", *Can J Plant Sci*, 46, pp. 479-485.
39. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi K. (2003), "*OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high salt and cold-responsive gene expression", *The plant J.*, 33, pp. 751-763.

40. Egawa C., Kobayashi F., Ishibashi M., Nakamura T., Nakamura C., Takumi S. (2006), “Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a *DREB2* homolog under abiotic stress condition in common wheat”, *Genes Genet. Syst.*, 81, pp. 77-91.
41. Engels C., Fuganti-Pagliarini R., Marin S.R.R., Marcelino-Guimarães F.C., Oliveira M.C.N., Kanamori N., Mizoi J., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Nepomuceno A.L. (2013), “Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration”, *Genet Mol Biol.*, 36, (4), pp. 556-565.
42. Fowler S.G., Cook D., Thomashow M.F. (2005), “Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, v2, and 3 is gated by the circadian clock”, *Plant Physiology.*, 137, pp. 961–968. 61
43. Fowler S., Thomashow M.F. (2002), “*Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway”, *The Plant Cell.*, 14, pp. 1675–1690.
44. Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D., Thomashow M.F. (2000), “Overexpression of *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation”, *Plant Physiology.*, 124, pp. 1854–1865.
45. Gupta K., Agarwal P.K., Reddy M.K., Jha B. (2010), “SbDREB2A, an A-2 type DREB transcription factor from extreme halophyte *Salicornia brachiata* confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*”, *Plant Cell Reports.*, 29, pp. 1131–1137.

46. Gutha L.R., Reddy A.R. (2008), "Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance", *Plant Mol. Biol.*, 68, pp. 533-555.
47. Guan Q.J., Wang L.F., Bu Q.Y., Wang Z.Y. (2014), "The rice gene OsZFP6 functions in multiple stress tolerance responses in yeast and *Arabidopsis*", *Plant Physiol Biochem.*, 82, pp. 1-8.
48. Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F., Zhang J.Z. (2002), "Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*", *Plant Physiology.*, 130, pp. 639-648.
49. Hettenhausen C., Sun G., He Y., Zhang H., Sun T., Qi J., Wu J. (2016), "Genome-wide identification of calcium dependent protein kinases in soybean and analyses of their transcriptional responses to insect herbivory and drought stress", *Nature Scientific Reports.* 6:18973.
50. Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouزيد R., Bidani A., Jaoua L., Savouré A., Jaoua S. (2005), "Overexpression of Δ 1-pyrroline-5- carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants", *Plant Sci*, 169, pp.746-752.
51. Hong J.P., Kim W.T. (2005), "Isolation and functional characterization of the Ca-D REBLP1 gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang)", *Planta* 220, pp. 875–888.
52. Hsieh T.H., Lee J.T., Yang P.T., Chiu L.H., Charng Y.Y., Wang Y.C., Chan M.T. (2002a), "Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers

- elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato”, *Plant Physiology*, 129, pp. 1086–1094.
53. Hsieh T.H., Lee J.T., Charng Y.Y., Chan M.T. (2002b), “Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress”, *Plant Physiology*, 130, pp. 618–626.
 54. Hussain M., Park H.W., Farooq M., Jabran H., Lee D.J. (2013), “Morphological and physiological basis of salt resistance in different rice genotypes”, *Int. J. Agric. Biol.*, 15, pp. 113-118.
 55. Huu Quan NGUYEN, Thi Kim Lien VU, Thi Ngoc Lan NGUYEN, Thi Thanh Nhan PHAM, Thi Hai Yen NGUYEN, Van Son LE, Hoang Mau CHU (2019), “Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants”, *Scientific Reports*, 9:19663.<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55895-0>.
 56. Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006), “Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice”, *Plant Cell Physiol.*, 47, pp. 141-153.
 57. Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F. (1998), “*Arabidopsis* CBF1 overexpression induces cor genes and enhances freezing tolerance”, *Science*, 280, pp. 104–106.
 58. Jan S., Alyemeni M.N., Wijaya L., Alam P., Siddique K.H., Ahmad P. (2018), “Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates cadmium stress via the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems and macronutrient content in *pisum sativum* l”, *Seedlings. BMC Plant Biol.*, 18(1), pp. 146. DOI 10.1186/s12870-018-1359-5.

59. Kashyap S.P., Prasanna H.C., Nishi K., PallaviM., Singh B. (2020), “Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and de novo assembly of wild tomato solanum chilense”, *Scientific Reports*, 10, Article number: pp. 15835. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72474-w>.
60. Kasuga M., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004), “A combination of the *Arabidopsis*DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer”, *Plant Cell Physiol.*, 45, pp. 346-350.
61. Kaya C., Tuna A.L., Okant A.M. (2010), “Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions”. *Turk. J. Agric. For.*, 34, pp. 529-538. DOI 10.3906/tar-0906-173.
62. Khan, M.S. (2011), “The role of dreb transcription factors in abiotic stress tolerance of plants”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment.*, 25, pp. 2433-2442. DOI <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0072>.
63. Kidokoro S., Watanabe K., Ohori T., Moriwaki T., Maruyama K., Mizoi J., Htwe N.M.P.S, Fujita Y., Sekita S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2015), “Soybean DREB1/CBF-type Transcription Factors Function in Heat and Drought as Well as Cold Stress-Responsive Gene Expression”, *J.Plant*, 81, pp.505-18.
64. Kobayashi F., Ishibashi M., Takumi S. (2008), “Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco”, *Transgenic Res.* (2008), 17(5), pp. 755-767.

65. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018), “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, 35, pp.1547-1549.
66. Kume S., Kobayashi F., Ishibashi M., Ohno R., Nakamura C., Takumi S. (2005), “Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/ Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance”, *Genes and Genetic Systems*, 80, pp. 185–197.
67. Larkindale J., Vierling E. (2008), “Core genome responses involved in acclimation to high temperature”, *Plant Physiology*, 146, pp. 748–761.
68. Lata C., Bhutty S., Bahadur R.P., Majee M., Prasad M. (2011a), “Association of a SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]”, *Journal of Experimental Botany* DOI: 10.1093/jxb/err016.
69. Lee S.J., Kang J.Y., Park H.J., Kim M.D., Bae M.S., Choi H.I., Kim S.Y. (2010), “DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity”, *Plant Physiology*, 153, pp. 716–727.
70. Li X.P., Tian A.G., Luo G.Z., Gong Z.Z., Zhang J.S., Chen S.Y. (2005), “Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses”, *Theoretical and Applied Genetics*, 110, pp. 1355–1362.
71. Li W.Y.F., Wong F.L., Tsai S.N., Phang T.H., Shao G. and Lam H.M. (2006), “Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance”, in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ.* 29, pp. 1122-1137.

72. Liu L., Zhu K., Yang Y., Wu J., Chen F., Yu D. (2008), “Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*)”, *Journal of Plant Research*, 121, pp. 215–226.
73. Liu N., Zhong N., Wang G., Li L., Liu X., He Y., Xia G. (2007), “Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DREbinding transcription factor from *Physcomitrella patens*”, *Planta*, 226, pp. 827–838.
74. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998), “Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively in *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, 10, pp. 391-406.
75. Liu Y.W., Chen M., Xu Z.S., Zh G.Y., Li L.C., Ma Y.Z. (2007), “Glycine max dehydration-responsive element binding protein 6 mRNA, complete cds”.GenBank EF551166,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF551166>.
76. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. *Methods Mol. Biol.*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
77. Lurin C., Geelen D., Barbier-Brygoo H., Guern J., Maurel C. (1996), “Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel”, *Plant Cell* 8, pp. 701-711. DOI <https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.701>

78. Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., and Oda, K.(2004), “Dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor”, *Plant J.*, 37, pp. 720-729.
79. Marcolino-Gomes J., Rodrigues F.A., Oliveira M.C.N., Farias J.R.B., Neumaier N., et al. (2013), “Expression Patterns of GmAP2/EREB-Like Transcription Factors Involved in Soybean Responses to Water Deficit”, *PLoS ONE*, 8(5): e62294. doi: 10.1371/journal.pone.0062294.
80. Matsukura S., Mizoi J., Yoshida T., Todaka D., Ito Y., Maruyama K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010), “Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes”, *Molecular Genetics and Genomics*, 283, pp. 185–196.
81. Maruyama, S., Ohkita, N., Nakayama, M., Akaboshi, E., Shibata, T., Funakoshi, E., Takeuchi, K., Ito, F., Kawasaki, K. (2012), “RecQ5 Interacts with Rad51 and Is Involved in Resistance of *Drosophila* to Cisplatin Treatment”, *Biol. Pharmaceut Bull*, 35(11), pp. 2017-2022.
82. Mei Z., Wei L., Yu-Ping B., Zi-Zhang W. (2009), “Isolation and identification of PNDREB1, a new DREB transcription factor from peanut (*Arachis hypogaea* L”, *Acta Agronomica Sinica*, 35, pp. 1973–1980.
83. Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P., Lopato S. (2011), “Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors”, *Plant Biotechnology Journal.*, 9, (2), pp. 230–249.

84. Munns R. and Tester M. (2008), “Mechanisms of salinity tolerance”.
Annu. Rev. Plant Biol. 59, 651–681.
85. Murashige T., Skoog F. (1962), “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures”, *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 473–497.
86. Nakamura, A., Fukuda, A., Sakai, S. and Tanaka, Y. (2006), “Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in Rice (*Oryza sativa* L.)”, *Plant Cell Physiol.* 47, pp. 32–42.
87. Nakashima K., Ito Y., Yamaguchi-Shinozaki K. (2009), “Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses”, *Plant Physiology*, 149, pp. 88–95.
88. Nakashima K., Shinwar Z.K., Sakuma Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2000), “Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high salinity-responsive gene expression”, *Plant Molecular Biology*, 42, pp. 657–665.
89. Navarro, C., Bullock, S., Lehmann, R. (2009), “Altered dynein-dependent transport in piRNA pathway mutants”, *Proc, Natl, Acad, Sci, U.S.A.*, 106(24), pp. 9691–9696.
90. Neumaier N., Carvalho J.F.C., Rolla- Santos A.A.P., Engels C., Farias J.R.B., Fuganti- Pagliarini R., Marcelino- Guimarães F.C., Marin S.R R., Mizoi J., Yamaguchi- Shinozaki K., Nepomuceno A.L. (2013), “Testing dreb genetically modified soybean plants for drought tolerance in both greenhouse and field conditions”, In: *World soybean research conference*, Durban, [Proceedings], pp. 216.

91. Nguyen Hoang Loc, Le Tran Binh, Le Thi Muoi (1991), “Desiccation and salt stress stimulate growth and regeneration of *Craterostigma plantagineum* Hochst In in vitro culture”, *Proc, NCSR Viet Nam*, 3, pp. 92-99.
92. Nguyen Q.H., Vu L.T.K., Nguyen L.T.N., Pham N.T.T., Nguyen Y.T.H., Le S.V., Chu M.H. (2019), “Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants”, *Scientific Reports*, vol. 9, pp.19663. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55895-0>.
93. Nguyen T.N.L., VaciaxaP., LoT.M.T., NguyenT.H.Y., PhamT.T.N., LeV.S., ChuH.M. (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.
94. Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J. (2004), “CBF2_DREB1C is a negative regulator of CBF1_DREB1B and CBF3_DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*”, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 101, pp. 3985–3990.
95. Oh S.J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.J., Kim M., Kim Y.K. (2005), “*Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth”, *Plant Physiol.*, 138, pp. 341-351.
96. Olhoft P.M., Bernal L.M., Grist L.B. and Ozias-Akins P. (2007), “A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings”, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43, pp. 536-549.

97. Olhoft P.M., Donovan C.M., Somers D.A. (2006), “Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants”, *Methods in molecular biology*, 343, pp. 385-396.
98. Paz M.M., Shou H., Guo Z., Zhang Z., Banerjee A.K., Wang K. (2004), “Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant”, *Euphytica*, 136, pp. 167–179.
99. Pellegrineschi A., Reynolds M., Pacheco M., Brito R.M., Almeraya R., Yamaguchi-Shinozaki K., Hoisington D. (2004), “Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions”, *Genome*, 47, pp. 493–500.
100. Peng J., Cheng J. and Wang Y. (2013), “Identifying cross-category relations in gene ontology and constructing genome-specific term association networks”, *BMC Bioinformatics*, 14, Suppl 2: S15.
101. Pham T.T.N., Nguyen H.Q., Nguyen T.N.L., Dao X.T., Sy D.T., Le V.S., Chu H.M. (2020), “Overexpression of the GmDREB2 gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants”, *Australian Journal of Crop Science*, vol. 14, pp. 495-503.
102. Phang T. H., Shao G. H., Lam H. M. (2008), “Salt tolerance in soybean”, *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 50, pp. 1196-1212.
103. Qin F., Kakimoto M., Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Tran L.S.P., Shinozaki K. (2007), “Yamaguchi-Shinozaki K. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L”, *Plant J.*, 50, pp. 54-69.

104. Qin F., Sakuma Y., Tran L.S.P., Maruyama K., Kidokoro S., Fujita Y., Fujita M., Umezawa T., Sawano Y., Miyazon K.I., Tanokur M., Shinozaki K., Shinozaki K.Y. (2008), “*Arabidopsis* DREB2A interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression”, *The Plant Cell*, 20, pp. 1693–1707.
105. Rahmawati N., Rosmayati, Delvian D., Mohammad B., Hirosuke O. (2019), “Evaluation of resistance improvement of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) against salinity using mass selection and gene expression of salinity tolerant”, *Proceedings of the International Conference on Natural Resources and Technology (ICONART)*, pp. 30-37.
106. Rehman, S., Abbas, G., Shahid, M., Saqib, M., Farooq, A.B.U., Hussain, M., Murtaza, B., Amjad, M., Naeem M.A., Farooq, A. (2019), “Effect of salinity on cadmium tolerance, ionic homeostasis and oxidative stress responses in conocarpus exposed to cadmium stress: Implications for phytoremediation”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, pp. 146-153. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.077>.
107. Saghai-Maroo M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. (1984), “Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, pp. 8014–8018, doi: 10.1073/pnas.81.24.8014.
108. Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., YamaguchiShinozaki K. (2002), “DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved

- in dehydration- and coldinducible gene expression”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, pp. 998- 1009.
109. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006a), “Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in droughtresponsive gene expression”, *The Plant Cell*, 18, pp. 1292–1309.
 110. Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006b), “Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat stress-responsive gene expression”, *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 103, pp. 18822–18827.
 111. Salmeron J., Janzen J., Soneji Y., Bump N., Kamens J., Allen H., Ley S.C. (2001), “Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal induced p105 proteolysis”, *Journal of Biological Chemistry*, 276, pp. 22215–22222.
 112. Sambrook J.F. and Russell D.W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vols 1, 2 and 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100 pp.
 113. Sarkar, T., Thankappan, R., Kumar, A., Mishra, G.P., Dobarra, J.R. (2014), “Heterologous expression of the atdrebl1a gene in transgenic peanut-conferred tolerance to drought and salinity stresses”, *PLoS ONE.*, 9, pp. 1-25. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110507>
 114. Savitch L.V., Allard G., Seki M., Robert L.S., Tinker N.A., Huner N.P.A., Shinozaki K., Singh J. (2005), “The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic

- capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*”, *Plant and Cell Physiology*, 46, pp. 1525–1539.
115. Schramm F., Larkindale J., Kiehlmann E., Ganguli A., English G., Vierling E., von Koskull-Doring P. (2008), “A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*”, *The Plant Journal*, 53, pp. 264–274.
 116. Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K. (2007), “Regulatory metabolic networks in drought stress responses”, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, pp. 296-302.
 117. Serraj R., Sinclair T.R. (2002), “Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions”, *Plant Cell Environ.*, 25, pp. 333-341. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00754.x>.
 118. Shigyo M., Ito M. (2004), “Analysis of gymnosperm two-AP2-domaincontaining genes”, *Dev. Genes Evol.*, 214, pp. 105-114.
 119. Shen Y.G., Zhang W.K., He S.J., Liu Q., Chen S.Y. (2003a), “An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor inducedby cold, dehydration and ABA stress”, *Theor. Appl. Genet.*, 106, pp. 923-930.
 120. Shen Y.G., Zhang W.K., Yan D.Q., Du B.X., Zhang J.S., Liu Q., Chen S.Y. (2003b), “Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte, *Atriplex hortensis*”, *Theoretical and Applied Genetics*, 107, pp. 155–161.
 121. Shiqing G., Huijan X., Xianguo C., Ming C., Zhaosi X., Liancheng L., Xingguo Y., Lipu D., Xiaoyan H., Youzhi M. (2005), “Improvement of

- wheat drought and salt tolerance by expression of a stress inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*)”, *Chinese Science Bulletin*, 50, pp. 2714–2723.
122. Shu K., Qi Y., Chen F., Meng Y., Luo X., Shuai H., Zhou W., Ding J., Du J., Liu, J., Yang F., Wang Q., Liu W., Yong T., Wang X., Feng Y., Yang W. (2017), “Salt stress represses soybean seed germination by negatively regulating gibberellin synthesis while positively mediating abscisic acid synthesis”, *Front. Plant Sci.*, 8, pp. 1372. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01372>.
 123. Shukla R.K., Raha S., Tripathi V., Chattopadhyay D. (2006), “Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco”, *Plant Physiology*, 142, pp. 113–123.
 124. Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi T., Dyer W.E., Ho T-H.D., Qu R. (2000), “Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene”, *Plant Science*, 155, pp. 1–9.
 125. Skirver K., Mundy J. (1990), “Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress”, *The Plant Cell*, 2, pp. 503–512.
 126. Southern E.M. (1975), “Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis”, *J Mol Biol*, 98, pp. 503–517, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0)
 127. Sun H., Shen L., Qin Y., Liu X., Hao K., Li Y., Wang J., Yang J., Wang F. (2018), “CLC-Nt1 affects Potato Virus Y infection via regulation of

- endoplasmic reticulum luminal Ph”, *New Phytol*, Oct., 220(2), pp. 539-552. doi: 10.1111/nph.15310. Epub 2018 Jul 19.
128. Tang M.J., Liu S., Chen Y.F. and Shen S. (2006), “Isolation and functional characterization of *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*”, *Plant Mol Bio*, 163, pp. 419-428.
 129. Thanh Son Lo, Hoang Duc Le, Vu Thanh Thanh Nguyen, Hoang Ha Chu, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2015), “Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco”, *Turk J Bot*, 39, pp. 988-995.
 130. Thi Thanh Nhan Pham, Huu Quan Nguyen, Thi Ngoc Lan Nguyen, Xuan Tan Dao, Danh Thuong Sy, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2020), “Overexpression of the *GmDREB2* gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants”, *Australian Journal of Crop Science*, 14, pp.495-503.
 131. Topping J.F. (1998), “Tobacco transformation”, *Methods Mol Biol.*, 81, pp. 365–372, <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:365>.
 132. Verma D.P.S. (1990), “Genetic engineering for proline biosynthesis and the role of proline in salt stress and symbiotic nitrogen fixation. In: Proceedings of the International expression & protein phosphorylation of RAB-17 in maize”, *Plant Mol Biol*, 14, pp. 423-432.
 133. Wang Q., Guan Y., Wu Y., Chen H., Chen F., Chu C. (2008), “Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice”, *Plant Molecular Biology*, 67, pp. 589–602.

134. Wang Y., He C. (2007), “Isolation and characterization of a cold-induced DREB gene from Aloe vera L”, *Plant Molecular Biology Reports*, 25, pp. 121–132.
135. Wei P., Che B., Shen L., Cui Y., Wu S., Cheng C., Liu F., Li M.W., Yu B., Lam H.M. (2019), “Identification and functional characterization of the chloride channel gene, gsclc-c2 from wild soybean”, *BMC Plant Biology.*, 19(1), pp. 1-15. DOI <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1732-Z>.
136. Xu D., Yu Y., Han Q., Ma Y., Gao S., Tian Y., Xu Z., Li L., Qu Y., Ma Y., Chen M., Chen Y. (2014), “Characteristics and Function of a GmDREB5-Interacting Protein GmUBC13 in Soybean”, *Scientia Agricultura Sinica*, 47(18), pp.3534-3544.
137. Xu Z.S., Ni Z.Y., Li Z.Y., Li L.C., Chen M., Gao D.Y., Yu X.D., Liu P., Ma Y.Z. (2009), “Isolation and functional characterization of HvDREB1: a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*”, *Journal of Plant Research*, 122, pp. 121–130.
138. Yamada T., Takagi K., Ishimoto M. (2012), “Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis”, *Breeding Science*, 61, pp. 480–494.
139. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2009), “DREB regulons in abiotic-stress-responsive gene expression in plants, In: Yamada T., Spangenberg G., eds, Molecular breeding of forage and turf”, *Springer Science+Business Media. LLC*, pp. 15–27.

140. Yang D.H., Kim S., Nam C. and Min J.W. (2007), “Developing a decision model for business process outsourcing”, *Computers & Operations Research*, 34(12), pp.3769 - 3778.
141. Yongbin Zhou, Ming Chen, Jinkao Guo, Yanxia Wang, Donghong Min, Qiyan Jiang, Hutai Ji, Chengyan Huang, Wei Wei, Huijun Xu, Xiao Chen, Liancheng Li, Zhaoshi Xu, Xianguo Cheng, Chunxiao Wang, Chengshe Wang, Youzhi Ma. (2020), “Overexpression of soybean *DREB1* enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field”, *Journal of Experimental Botany*, 71, pp. 1842–1857.
142. Zeng P., Vadnais D. A., Zhang Z., Polacco J.C. (2004), “Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]”, *Plant Cell Rep.*, 22, pp. 478-482.
143. Zhang G.C., Zhu W.L., Gai J.Y., Zhu Y.L. and Yang L.F. (2015), “Enhanced salt tolerance of transgenic vegetable soybeans resulting from overexpression of nov 1 Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from *Solanum torvum* Swartz”, *Hort Envir Bio*, 56, pp. 94-104. DOI <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0084-3>.
144. Zhang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.K. (2004), “From laboratory to field, “Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops”, *Plant Physiology*, 135, pp. 615–621.
145. Zhang X., Tang W., Liu J., & Liu Y. (2014), “Co-expression of rice OsP5CS1 and OsP5CS2 genes in transgenic tobacco resulted in elevated proline biosynthesis and enhanced abiotic stress tolerance”, *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology.*, 20(4), pp.717–722. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2014.03010>

146. Zhang X.X., Tang Y.J., Ma Q.B., Yang C.Y., Mu Y.H., Suo H.C., Luo L.H., Nian H. (2013), “OsDREB2A, a Rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean”, *PLoS One* 8, e83011. doi:83010.81371/journal.pone.0083011.
147. Zhu J.K. (2001), “Plant salt tolerance”, *Trends Plant Sci*, 6, pp. 66-71.
148. Zifarelli G., Pusch M. (2010), “CLC transport proteins in plants “, *FEBS Letters* 584, pp. 2122-2127.

Trang web

149. <http://legacy.tropicos.org/Image/83265>
150. <http://legacy.tropicos.org/Image/100005223>
151. <http://camnangcaytrongcom.blogspot.com/search/label/c%C3%A2y%20%C4%91%E1%BA%ADu%20n%C3%A0nh>
152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glycine+max+gene+for+dehydration-responsive+element-binding+protein> (Updated on 9-May-2020)
153. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=Soybean+gene+for+DREB2%2C+Chu+MH/> (Updated on 9-May-2020)
154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=Soybean+gene+for+DREB5%2C+Chu+MH/> (Updated on 9-May-2020).
155. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026#/15596026>
156. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1621#/K1621>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Dữ liệu trình tự gen *GmDREB* và protein thuộc phân họ DREB của đậu tương sử dụng trong phân tích (cập nhật ngày 9 tháng 5 năm 2020)

T	Gene/Gene ID	Tên gen <i>DREB</i> của đậu tương	Vị trí trên n NS T	Mã số của gen trên GenBank	Mã số của protein trên GenBank
1.	DREB/ 100499747	GmDREB	13	BT089389	ACU13469
2.	DREB/ 100527471	GmDREB	13	BT092314	ACU16563
3.	DREB/ 100499747	GmDREB	13	AY244760	AAP83131
4.	DREB/ 100499747	GmDREB	13	NM_00124853 7	NP_001235466
5.	GmDREB*	GmDREB	13	GmDREB; DT2008	DREB_DT200 8
6.	AP2-2/ 100813069	GmAP2-2	4	NM_00125276 5	NP_001239694
7.	AP2-Ile-DBDP/ 100819565	GmAP2-Ile- DBDP	16	NM_00128057 5	NP_001267504
8.	DREB1/ 547622*	GmDREB1	9	HE647687; PB	CCF23018_PB
9.	DREB1/ 547622	GmDREB1	9	FJ965342	ACR44232

10.	DREB1/547622*	GmDREB1	9	FR822736; XBB	CBZ41764_X BB
11.	DREB1/547622*	GmDREB1	9	HE647688; VNS	CCF23019_V NS
12.	DREB1/547622*	GmDREB1	9	HE647689; YS	CCF23020_YS
13.	DREB1/547622	GmDREB1	14	NM_00124885 0	NP_001235779
14.	DREB1B/100813 230	GmDREB1B	10	XM_00353699 7	XP_003537045
15.	DREB1D/100778 541	GmDREB1D	13	XM_00659413 5	XP_006594198
16.	DREB1E/100789 097	GmDREB1E	1	XM_00351740 7	XP_003517455
17.	DREB1E/100797 582	GmDREB1E	10	XM_00353643 5	XP_003536483
18.	DREB1E/100779 318	GmDREB1E	17	XM_00355083 2	XP_003550880
19.	DREB1F/100810 401	GmDREB1F	12	XM_00354073 8	XP_003540786
20.	DREB1F/100795 696	GmDREB1F	5	XM_00352549 2	XP_003525540
21.	DREB1F/100793 751	GmDREB1F	11	XM_00353913 1	XP_003539179
22.	DREB1F/100815 039	GmDREB1F	12	XM_00353941 2	XP_003539460
23.	DREB1F/100803	GmDREB1F	13	XM_00354192	XP_003541976

317			8		
24.	DREB2/ 732579	GmDREB2	6	DQ208968	ABB36645
25.	DREB2/732579	GmDREB2	6	FJ965341	ACR44231
26.	DREB2/732579*	GmDREB2	6	HG965097; CB	CDO19437_C B
27.	DREB2/ 732579	GmDREB2	6	DQ054363	AAAY89658
28.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	LK936508; DT51	CDU32446_D T51
29.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	LK936509; DT26	CDU32447_D T26
30.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	HG965098; DVN5	CDO19438_D VN5
31.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	HG965099; CBD	CDO19439_C BD
32.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	HG965100; BG	CDO19440_B G
33.	DREB2/ 732579*	GmDREB2	6	HG965101; BS	CDO19441_B S
34.	DREB2/ 100801528	GmDREB2	4	JF946769	AEQ61581
35.	DREB2/1008015 28*	GmDREB2	4	LK936507;DT2 008	CDU32445_DT 2008
36.	DREB2/ 100801528	GmDREB2	4	XM_02612816 5	XP_025983950
37.	DREB2/ 732579	GmDREB2	6	NM_00125032 5	NP_001237254

38.	DREB2A2/1008 00134	GmDREB2A 2	14 3	NM_00125401	NP_001240942
39.	AP2-8/ 100798277	GmDREB2C -like	2 6	NM_00125307	NP_001240005
40.	DREB2C-like/ 100783729	GmDREB2C -like	6 3	XM_00658092	XP_006580986
41.	DREB2D/ 10079005	GmDREB2D	4 5	XM_00352351	XP_003523563
42.	DREB2D/100797 850	GmDREB2D	6 1	XM_00352783	XP_003527879
43.	DREB2F/100808 363	GmDREB2F	2 2	XM_00351806	XP_003518110
44.	DREB2F/100819 966	GmDREB2F	3 6	XM_00352047	XP_003520524
45.	DREB2F/100808 719	GmDREB2F	10 6	XM_00352511	XP_003525164
46.	DREB2F/100801 311	GmDREB2F	19 2	XM_00355337	XP_003553420
47.	DREB3/ 732559	GmDREB3	4 4	NM_00125002	NP_001236953
48.	DREB3/ 732559	GmDREB3	4	DQ055133	AAZ03388
49.	DREB3/ 732656	GmDREB3	17 1	NM_00125157	NP_001238500
50.	DREB3(AP2-1)/ 100794316	GmDREB3- like	3 7	NM_00125442	NP_001241356
51.	DREB3/	GmDREB3	1	XM_00351702	XP_003517069

	100804801		1		
52.	DREB3/ 100804056	GmDREB3	7	XM_00352971	XP_003529759
			1		
53.	DREB3/ 100783790	GmDREB3	9	XM_00353438	XP_003534428
			0		
54.	DREB3/ 100817503	GmDREB3	11	XM_00353870	XP_003538748
			0		
55.	DREB3/ 100784419	GmDREB3	13	XM_00354204	XP_003542090
			2		
56.	DREB3-like/ 100786075	GmDREB3- like	1	XM_00351641	XP_003516461
			3		
57.	DREB5/1001018 98*	GmDREB5	12	HE648567; XBB	CCF23312_XB B
58.	DREB5/1001018 98*	GmDREB5	12	HE648568; BGi	CCF23313_BG i
59.	DREB5/ 100101898	GmDREB5	12	EF583447	ABQ53928
60.	DREB5/1008098 87*	GmDREB5	13	FR822737; XTD	CBZ41765_XT D
61.	DREB5/1008098 87*	GmDREB5	13	HE598783; PB	CCD42020_PB
62.	DREB5/1008098 87*	GmDREB5	13	HE647690: NS	CCF23021_NS
63.	DREB5/ 100101898	GmDREB5	12	NM_00124817	NP_001235100
			1		
64.	DREB6/	GmDREB6	5	EF551166	ABQ42205

	100101914				
65.	DREB6/ 100101914	GmDREB6	5	NM_00124841 2	NP_001235341
66.	DREB6*	GmDREB6	5	GmDREB6; DT2008	DREB6_DT20 08
67.	DREB7/ 100101894	GmDREB7	20	NM_00124810 8	NP_001235037
68.	DREBa/ 100788110	GmDREBa	12	NM_00135834 7	NP_001345276
69.	DREBa/ 100788110	GmDREBa	12	AY542886	AAT12423

Ghi chú: Dấu * chú thích cho gen GmDREB được phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam của nhóm tác giả [142],[143]; NST: nhiễm sắc thể.