

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGÔ MẠNH DŨNG

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *codA* NHẪM NÂNG CAO
KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG
(*Glycine max* (L.) Merrill)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 12/2021

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGÔ MẠNH DŨNG

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *codA* NHẪM NÂNG CAO
KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG
(*Glycine max* (L.) Merrill)

Ngành: Di truyền học
Mã số: 9420121

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS Chu Hoàng Hà
2. GS.TS Chu Hoàng Mậu

THÁI NGUYÊN - 12/2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Chu Hoàng Hà và GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Các kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án là trung thực và mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc. Một phần kết quả đã được công bố trên các tạp chí và hội nghị khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả, phần còn lại chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các kết quả đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng 12 năm 2021

TÁC GIẢ

Ngô Mạnh Dũng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS Chu Hoàng Hà và GS.TS. Chu Hoàng Mậu, người đã trực tiếp hướng dẫn, định hướng, giúp đỡ, động viên tôi có được sự tự tin, khắc phục khó khăn để hoàn thành tốt bản luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới PGS.TS. Phạm Bích Ngọc, TS. Đỗ Tiến Phát, ThS Tạ Thị Đông, ThS Nguyễn Hồng Nhung và các cán bộ, nghiên cứu viên phòng Công nghệ ADN ứng dụng, 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 đã giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành các thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và cán bộ trong bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã giúp tôi tích lũy nhiều kiến thức, phương pháp nghiên cứu về các vấn đề hiện đại của sinh học và công nghệ sinh học, đồng thời đưa ra nhiều đóng góp quý báu để tôi có thể hoàn thành kế hoạch học tập và nghiên cứu.

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

Tôi xin bày tỏ lòng tri ân và biết ơn sâu sắc tới thầy cô, gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên và chia sẻ khó khăn trong suốt chặng đường học tập, nghiên cứu của tôi thời gian qua.

Thái Nguyên, tháng 12 năm 2021

TÁC GIẢ

Ngô Mạnh Dũng

MỤC LỤC

Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục các chữ viết tắt.....	vi
Danh mục hình	ix
Danh mục bảng.....	xi
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	6
1.1. TÁC ĐỘNG CỦA HẠN VÀ CƠ CHẾ CHỊU HẠN Ở THỰC VẬT.....	6
1.1.1. Ảnh hưởng của stress hạn đến sự sinh trưởng, phát triển và đặc tính sinh lý, sinh hoá của thực vật.....	6
1.1.2. Phản ứng của thực vật trong điều kiện stress hạn	11
1.2. GLYCINE BETAINE, CHOLINE OXIDASE	18
1.2.1. Glycine betaine.....	18
1.2.2. Choline oxidase	23
1.3. NÂNG CAO KHẢ NĂNG CHỊU HẠN Ở ĐẬU TƯƠNG BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN.....	29
1.3.1. Cây đậu tương	29
1.3.2. Chuyển gen ở đậu tương thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
1.3.3. Nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen	33
1.3.4. Tình hình nghiên cứu chuyển gen <i>codA</i> ở thực vật	38
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	46
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	46
2.1.1. Vật liệu thực vật	46
2.1.2. Các chủng vi khuẩn và các loại vector	46
2.1.3. Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR.....	46
2.2. HOÁ CHẤT, THIẾT BỊ.....	48
2.2.1. Hoá chất.....	48

2.2.2. Thiết bị.....	48
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.3.1. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen <i>codA</i> và chuyển gen ở thuốc lá.....	49
2.3.2. Nhóm phương pháp nghiên cứu điều kiện thích hợp cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22	53
2.3.3. Nhóm phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen <i>codA</i>	55
2.3.4. Phân tích và xử lý dữ liệu	60
2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	61
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	62
3.1. THIẾT KẾ VÀ BIỂU HIỆN VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN <i>CODA</i>	62
3.1.1. Tạo cấu trúc chuyển gen <i>codA</i>	62
3.1.2. Đánh giá hoạt động của vector mang gen chuyển <i>codA</i> trên cây thuốc lá.....	66
3.1.3. Thảo luận kết quả thiết kế vector và hoạt động của vector biểu hiện trên cây thuốc lá.....	69
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN <i>CODA</i> Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22	72
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tạo chồi đậu tương	73
3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn và thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương	74
3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi đậu tương.....	78
3.2.4. Thảo luận kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen <i>codA</i> ở giống đậu tương ĐT22.....	79
3.3. BIẾN NẠP GEN <i>CODA</i> VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22 VÀ TẠO CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN CHỊU HẠN	82
3.3.1. Kết quả chuyển gen <i>codA</i> vào giống đậu tương ĐT22	82
3.3.2. Phân tích cây đậu tương chuyển gen	84
3.3.3. Thử nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen	90

3.3.4. Thảo luận kết quả biến nạp gen <i>codA</i> vào giống đậu tương ĐT22 và thử nghiệm khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen.....	98
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	101
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	102
TÀI LIỆU THAM KHẢO	103

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABA	Absciscic acid	
APX	Ascorbate peroxidase	
BADH	Betaine aldehyde dehydrogenase	
BAP	6-benzyladenine purin	
<i>bar</i>	<i>Bialaphos resistance</i>	
bp	Base pair	Cặp base
CAM	Crassulacean acid metabolism	
CAT	Catalase	
CCM	Cocultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
CHDH	Choline dehydrogenase	
CMO	Choline monooxygenase	
COD	Choline oxidase	
<i>codA</i>	Choline oxidase from <i>Agrobacterium globiformis</i>	
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	
DHAR	Dehydroascorbate reductase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	
DW	Dry weight	Khối lượng khô
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
FAD	Flavin adenine dinucleotide	
FW	Fresh weight	Khối lượng tươi
GA ₃	Gibberellic acid	
GB	Glycine Betaine	
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm
HSP	Heat shock protein	

IAA	Indoleacetic acid	
IBA	Indole-3-butyric acid	
kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
LEA	Late embryogenesis abundant	
MAPK	Microtubule associated protein kinase	
MDA	Malondialdehyde	
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase	
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic	
MS	Murashige and Skoog	Môi trường dinh dưỡng cơ bản MS
mRNA	Messenger ribonucleic acid	
NAA	α -Naphthaleneacetic acid	
OD	Optical density	Mật độ quang
<i>pat</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PEAMT	phosphoethanolamine N-methyltransferase	
PEG	Polyethylene glycol	
PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase	
PHBH	p-hydroxybenzoate hydroxylase	
POD	Peroxidase	
PPT	Phosphinothricin	
<i>rd29A</i>	<i>Response-to-Dehydration 29A</i>	
RM	Rooting medium	Môi trường ra rễ
ROS	Reactive oxygen species	
SEM	Shoot elongation medium	Môi trường kéo dài chồi

SIM	Shoot induction medium	Môi trường tạo chồi
SOD	Superoxide dismutase	
<i>Taq polymerase</i>	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Vùng DNA plasmid chuyển vào thực vật
Ti- plasmid	Tumor inducing - plasmid	
T ₀ , T ₁		Các thế hệ cây chuyển gen
KLK		Khối lượng khô
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
WT	Wild type	Cây không biến nạp
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside	
YEP	Yeast extract peptone	Cao chiết nấm men

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc không gian (a) và cấu trúc phân tử (b) của GB.....	19
Hình 1.2. Các con đường sinh tổng hợp GB	20
Hình 1.3. Quá trình oxy hóa choline thành GB xúc tác bởi choline oxidase.....	24
Hình 1.4. Cấu trúc không gian của choline oxidase độ phân giải 1,86 Å.....	24
Hình 1.5. Vị trí hoạt động của choline oxidase kiểu đại với sản phẩm hoạt động... liên kết với GB [150]	25
Hình 1.6. Lối vào vị trí hoạt động của choline oxidase [137].....	26
Hình 2.1. Trình tự gen <i>codA</i> được tổng hợp bởi Epoch Life Science Inc.	47
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.....	49
Hình 2.3. Sơ đồ các vector <i>pIBTII-rd29A-codA</i> , <i>pIBTII-HSP-codA</i> , <i>pIBTII-35S- codA</i>	51
Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm cắt vector <i>pIBTII</i> và <i>pCAMBIA</i> bằng enzyme <i>HindIII</i> và <i>EcoRI</i>	62
Hình 3.2. Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn <i>E. coli</i> chứa các vector thiết kế.....	64
Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm cắt kiểm tra plasmid <i>pIBTII</i> mang các cấu trúc gen thiết kế	64
Hình 3.4. Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn <i>A. tumefaciens</i> C58 mang các cấu trúc gen thiết kế.....	65
Hình 3.5. Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá chuyển gen .	67
Hình 3.6. Chồi thuốc lá chuyển gen chọn lọc trên môi trường bổ sung PPT 1,5 mg/l .	67
Hình 3.7. Kết quả gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% các dòng thuốc lá chuyển gen.....	68
Hình 3.8. Kết quả định lượng hàm lượng GB trong các dòng thuốc lá chuyển gen	69
Hình 3.9. Các mảnh lá mầm trên môi trường chọn lọc SIM2 với nồng độ PPT khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy	74

Hình 3.10. Các mảnh lá mầm sau các thời gian đồng nuôi cấy khác nhau.....	77
Hình 3.11. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp và tạo cây đậu tương chuyển gen ...	83
Hình 3.12. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T ₀ bằng PPT	84
Hình 3.13. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T ₁ bằng PPT	84
Hình 3.14. Kết quả kiểm tra cây T ₀ bằng PCR	86
Hình 3.15. Kết quả kiểm tra cây T ₁ bằng PCR	86
Hình 3.16. Kết quả phân tích Southern blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T ₁	88
Hình 3.17. Kết quả phân tích Western blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T ₁	89
Hình 3.18. Khả năng nảy mầm của đậu tương sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường hạn nhân tạo	90
Hình 3.19. Chiều dài thân mầm của các dòng hạt đậu tương trên môi trường hạn nhân tạo	91
Hình 3.20. Kiểu hình của các dòng đậu tương vào ngày thí nghiệm thứ 9 trong điều kiện hạn nhân tạo	93
Hình 3.21. Sinh khối thu được vào ngày thứ 9 của các dòng đậu tương trong thí nghiệm chịu hạn nhân tạo	94
Hình 3.22. Hàm lượng GB của các dòng đậu tương chịu hạn	95
Hình 3.23. Hàm lượng proline của các dòng đậu tương chịu hạn.....	95
Hình 3.24. Hàm lượng MDA của các dòng đậu tương chịu hạn.....	96
Hình 3.25. Hoạt độ POD của các dòng đậu tương chịu hạn.....	97

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số loài cây trồng chuyển gen <i>codA</i> mã hóa choline oxidase sinh tổng hợp GB tăng khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học	44
Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi đặc hiệu	47
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng nối với T4 ligase.....	52
Bảng 2.3. Môi trường nuôi khuẩn	54
Bảng 2.4. Thành phần môi trường sử dụng trong chuyển gen <i>codA</i> ở đậu tương ...	56
Bảng 3.1. Kết quả biến nạp gen <i>codA</i> vào giống thuốc lá K326 sử dụng PPT sàng lọc.....	66
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tạo chồi.....	74
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi.....	75
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cây đến khả năng cảm ứng tạo chồi	77
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến khả năng diệt khuẩn và tạo chồi của các mảnh lá mầm sau chuyển gen.....	78
Bảng 3.6. Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá mầm đậu tương	82
Bảng 3.7. Kết quả biến nạp các cấu trúc chuyển gen <i>codA</i>	85
Bảng 3.8. Các dòng đậu tương thế hệ T ₁ có biểu hiện gen <i>codA</i> và có khả năng chống chịu hạn.....	87

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Biến đổi khí hậu đang diễn ra trên quy mô toàn cầu dẫn tới tình trạng hạn hán, đặc biệt là hạn mặn ngày càng kéo dài, gây khó khăn lớn cho ngành sản xuất nông nghiệp. Bên cạnh đó, biến đổi khí hậu cũng khiến diện tích đất sản xuất nông nghiệp bị thu hẹp, gia tăng sự suy thoái đất, xói mòn rửa trôi, thường xuyên khan hiếm về nguồn nước. Stress hạn đã trở thành một trở ngại lớn đối với nền sản xuất nông nghiệp, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng nông nghiệp toàn cầu. Cường độ và mức độ nghiêm trọng của hạn hán được dự đoán sẽ còn gia tăng trong thời gian tới [109]. Vì vậy, việc chọn tạo giống các cây trồng có khả năng chịu hạn nhằm ứng phó với những tác động của biến đổi khí hậu là vấn đề mang tính cấp thiết và thời sự.

Đậu tương là một trong những cây nông nghiệp quan trọng trên thế giới, là nguồn cung cấp protein bổ dưỡng với chi phí thấp, được sử dụng làm thức ăn cho con người và gia súc với các sản phẩm đa dạng từ sử dụng trực tiếp hạt thô đến chế biến thành phẩm... Ngoài ra, đậu tương còn giữ vai trò cải tạo đất nông nghiệp do khả năng cố định nitơ trong khí quyển. Tại Việt Nam, cây đậu tương giữ vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng, tuy nhiên, năng suất đậu tương ở Việt Nam còn thấp, diện tích trồng trọt chưa được mở rộng nhiều. Nguyên nhân chính là chưa có giống đậu tương phù hợp, quy mô sản xuất nhỏ lẻ và điều kiện thời tiết không thuận lợi. Cây đậu tương tuy có thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng thích ứng rộng, có thể bố trí phù hợp với nhiều cơ cấu cây trồng trong sản xuất, nhưng lại thuộc nhóm cây trồng chịu hạn kém. Đậu tương dễ bị tổn thương bởi các stress phi sinh học và hạn là một nguyên nhân chính làm giảm năng suất, sản lượng đậu tương. Những ảnh hưởng nổi bật nhất của hạn là giảm khả năng nảy mầm, cây sinh trưởng phát triển kém, còi cọc, giảm quang hợp, giảm khả năng hút khoáng. Trong bối cảnh hiện nay, vấn đề nâng cao khả năng chịu hạn ở cây đậu tương để giảm thiểu thiệt hại

năng suất trong điều kiện môi trường thiếu nước là nhiệm vụ cấp bách của các nhà chọn giống cây trồng nông nghiệp.

Trên thế giới, việc cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương đã được quan tâm nghiên cứu với nhiều hướng tiếp cận khác nhau, như sử dụng kỹ thuật chọn lọc quần thể, lai giống hữu tính, đột biến thực nghiệm và ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại. Trong đó, những hiểu biết và tiến bộ của các kỹ thuật chuyển gen hiện nay đã mở ra triển vọng lớn trong việc cải thiện đặc tính chịu hạn của cây đậu tương. Đối với thực vật, đặc tính chịu hạn là tính trạng số lượng phức tạp, chịu ảnh hưởng của một hệ thống các gen mục tiêu cũng như sự chi phối của các yếu tố môi trường, vật lý và hoá học. Sản phẩm của các gen này tác động trực tiếp đến sự biểu hiện của đặc tính chịu hạn hoặc điều hòa chức năng nhóm gen chịu hạn, như kiểm soát sự đóng mở khí khổng, giảm nồng độ ROS (reactive oxygen species), tăng cường phát triển bộ rễ, điều chỉnh thẩm thấu, bảo vệ tính toàn vẹn của màng, ổn định cấu trúc enzyme hoặc protein... [68].

Khi gặp điều kiện khô hạn, thực vật thường có xu hướng tăng cường tổng hợp, tích lũy các chất chuyển hoá như các loại đường tan, amino acid... để điều chỉnh áp suất thẩm thấu cho tế bào. Vì vậy, một trong các hướng nghiên cứu tiếp cận cơ chế chống chịu hạn hiện nay chính là làm gia tăng các chất giúp bảo vệ áp suất thẩm thấu của tế bào khỏi sự mất cân bằng về nước. Trong đó, glycine betaine (GB) là một trong những chất bảo vệ thẩm thấu được nghiên cứu rộng rãi nhất. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, GB là chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện bất lợi. Nhiều loại gen đã được sử dụng để tạo ra cây chuyển gen có sự tăng tích lũy GB đã cho thấy sự hiệu quả trong việc tăng cường khả năng chịu đựng các stress phi sinh học và tăng năng suất. Một số cây trồng chuyển gen mã hoá enzyme liên quan đến sinh tổng hợp GB cũng thể hiện khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường như chịu nóng [175]; chịu lạnh [134]; chịu hạn [171] và chịu mặn [160].

Trong số các con đường sinh tổng hợp GB ở các đối tượng sinh vật khác nhau, con đường sinh tổng hợp GB từ tiền chất choline xúc tác bởi enzyme choline oxidase (COD) được mã hóa bởi gen *codA* là có hiệu quả và đơn giản nhất. Gen *codA* đã trở thành mục tiêu nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học đối với kỹ thuật trao đổi chất của các loài thực vật quan trọng về mặt kinh tế để chống chịu stress thâm thấu [133]. Phương pháp chuyển gen *codA* từ *Arthrobacter globiformis* vào các loại cây trồng không tích lũy GB tự nhiên như đậu xanh [21]; khoai tây [38]; cà chua [164]... để nâng cao khả năng chống chịu trong các điều kiện stress phi sinh học khác nhau đã chứng minh sự đơn giản và hiệu quả của phương pháp này. Tại Việt Nam, gen *codA* mã hoá sinh tổng hợp GB đã được chuyển thành công vào cây xoan [5], [9] và cây thuốc lá [78]; các cây chuyển gen này có khả năng chịu hạn, chịu mặn hơn so với các cây đối chứng không chuyển gen. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *codA* liên quan đến sinh tổng hợp GB nhằm nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương giúp cây phát triển tốt hơn, cho năng suất và sản lượng cao hơn trong điều kiện môi trường bất lợi là nghiên cứu mang tính thực tiễn và cần thiết.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và nhu cầu thực tiễn về tạo giống đậu tương có khả năng chống chịu hạn bằng công nghệ chuyển gen, chúng tôi lựa chọn thực hiện đề tài luận án “**Nghiên cứu chuyển gen *codA* nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill)**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Biến nạp được cấu trúc mang gen chuyển *codA* vào đậu tương và tạo được cây đậu tương chuyển gen *codA* mã hóa choline oxydase có khả năng chịu hạn cao hơn cây không chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu tạo cấu trúc chuyển gen mang gen *codA* trong vector biểu hiện thực vật

- 1) Thiết kế vector biểu hiện gen thực vật chứa cấu trúc mang gen *codA*.
- 2) Biến nạp cấu trúc chuyển gen mang gen *codA* vào mô cây thuốc lá. Đánh giá hoạt động và biểu hiện gen chuyển *codA* trên các dòng thuốc lá chuyển gen.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố nhằm thăm dò hiệu quả chuyển gen *codA* ở cây đậu tương

- 1) Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ phosphinothricin (PPT) đến khả năng tạo chồi từ lá mầm đậu tương.
- 2) Phân tích ảnh hưởng của nồng độ khuẩn và thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cây đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương.
- 3) Phân tích ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi đậu tương.

3.3. Nghiên cứu biến nạp cấu trúc mang gen *codA* vào giống đậu tương DT22 và tạo cây đậu tương chuyển gen chịu hạn

- 1) Biến nạp di truyền và tạo cây đậu tương chuyển gen *codA*.
- 2) Phân tích cây đậu tương chuyển gen *codA*.
- 3) Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen *codA*.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam tạo thành công cây đậu tương mang gen *codA* tăng khả năng chịu hạn so với cây đậu tương không biến nạp. Luận án là công trình có hệ thống với nội dung được trình bày từ thiết kế vector chuyển gen thực vật, phân tích biểu hiện gen và tạo dòng cây chuyển gen *codA* có hàm lượng GB tích lũy cao.

Cụ thể là:

- 1) Đã xác định được các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* và tạo đa chồi ở giống đậu tương DT22. Nồng độ PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và nồng độ PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM; dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ = 0,6, thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng

nuôi cấy 5 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l là thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.

2) Lần đầu tiên gen *codA* được chuyển thành công và biểu hiện ở cây đậu tương Việt Nam. Sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trong cây đậu tương chuyển gen đã làm tăng hàm lượng GB, proline, tăng hoạt độ của POD, giảm hàm lượng MDA so với cây đậu tương không chuyển gen.

3) Bốn dòng đậu tương chuyển gen *codA* ở thế hệ T₁ đã được đánh giá, hàm lượng GB ở dòng đậu tương chuyển gen tăng từ 248,9% - 288,3% so với cây không chuyển gen; hàm lượng proline tăng 1,5 - 2 lần, hoạt động của POD tăng lên gấp 4 lần và hàm lượng MDA giảm 0,5 lần so với cây không chuyển gen.

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

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

Về mặt khoa học, kết quả của luận án đã chứng minh được sự tăng cường biểu hiện gen *codA* mã hóa enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp GB đã làm tăng khả năng chống chịu hạn ở cây đậu tương. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để cải thiện khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi của ngoại cảnh ở thực vật nói chung và cây họ đậu nói riêng bằng kỹ thuật biểu hiện gen. Kết quả đăng tải trên các bài báo khoa học là tài liệu tham khảo có giá trị phục vụ nghiên cứu và giảng dạy sinh học.

Về mặt thực tiễn, các dòng đậu tương chuyển gen *codA* có thể được sử dụng làm vật liệu phục vụ chọn giống đậu tương có khả năng chống chịu hạn, đáp ứng một phần nhu cầu đậu tương đang thiếu trong nước hiện nay. Kết quả nghiên cứu của luận án có thể áp dụng vào các giống cây họ đậu và các loài thực vật khác trong định hướng nghiên cứu nhằm nâng cao hàm lượng GB giúp tăng khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TÁC ĐỘNG CỦA HẠN VÀ CƠ CHẾ CHỊU HẠN Ở THỰC VẬT

1.1.1. Ảnh hưởng của stress hạn đến sự sinh trưởng, phát triển và đặc tính sinh lý, sinh hoá của thực vật

1.1.1.1. Tác động của hạn đến sự sinh trưởng và phát triển

Stress hạn được hiểu và định nghĩa dưới nhiều góc độ khác nhau. Trong nông nghiệp, stress hạn là hiện tượng xảy ra khi môi trường không đủ nước cho sự sinh trưởng và phát triển bình thường của cây trồng tại một thời điểm nhất định. Mức độ nghiêm trọng của stress hạn phụ thuộc vào thời gian và cường độ hạn, lượng mưa, khả năng giữ nước của đất, sự thoát hơi nước của lá và sức sống của thực vật [136].

Thực vật chịu áp lực của stress hạn khi độ ẩm trong đất thấp, lượng nước có sẵn cho rễ giảm hoặc/và khi tốc độ thoát hơi nước của lá cao hơn so với mức độ hấp thu nước của rễ. Các triệu chứng hạn ở thực vật khác nhau giữa các loài thực vật, tùy thuộc vào khả năng chống chịu, điều kiện sinh trưởng, giai đoạn phát triển và các yếu tố của môi trường. Các triệu chứng này bao gồm cả những thay đổi về mặt hình thái như héo rũ, rụng lá, già hoá sớm cũng như sự thay đổi ở cấp độ tế bào: giảm sức trương, đóng khí khổng, mất cân bằng áp suất thẩm thấu và tăng sản xuất ROS.

Một số thực vật có khả năng chống chịu với điều kiện khô hạn. Khả năng chịu hạn là một đặc điểm phức tạp xảy ra thông qua một số cơ chế: (i) trốn hạn (tăng tốc giai đoạn sinh sản của cây trước khi bị stress có thể cản trở sự tồn tại của nó), (ii) tránh hạn (chịu đựng với lượng nước bên trong tăng lên và ngăn ngừa tổn thương mô) và (iii) chịu hạn (khả năng chịu đựng với hàm lượng nước bên trong thấp trong khi vẫn duy trì sự phát triển trong thời gian khô hạn) [24]. Sau một thời gian khô hạn, tỷ lệ cây sống sót khi được tưới lại được gọi là tỷ lệ sống sót trong hạn hán.

Stress hạn là một yếu tố ảnh hưởng đến hình thái, sinh lý và sự phát triển của

cây từ giai đoạn hạt nảy mầm, phát triển chồi và rễ, thân và lá cho đến giai đoạn sinh sản [109]. Giai đoạn hạt nảy mầm là giai đoạn rất nhạy cảm với stress hạn. Trong điều kiện hạn hán, quá trình nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây non có nhiều thay đổi đáng chú ý, như giảm số lượng và tỷ lệ nảy mầm của hạt; giảm chiều dài, khối lượng chất khô của rễ và chồi; giảm khả năng sống sót của cây con, kéo dài thời gian nảy mầm của hạt [128]. Độ ẩm đóng vai trò thiết yếu trong việc kích hoạt enzyme trong quá trình nảy mầm. Tỷ lệ nảy mầm bị giảm đáng kể ở cây đậu gà (*Cicer arietinum* L.) trong điều kiện thiếu nước [20].

Trong giai đoạn sinh trưởng của cây, ảnh hưởng sớm nhất khi gặp stress hạn là héo lá, giảm chiều cao cây, gián đoạn quá trình hình thành chồi và hoa. Chiều cao thực vật có liên quan chặt chẽ đến kích thước tế bào và sự già hoá của lá. Chiều cao cây giảm chủ yếu là do giảm khả năng hút, vận chuyển khoáng trong cây, giảm khả năng phân chia và kích thước tế bào, tăng rụng lá trong điều kiện khô hạn [169]. Nước có ảnh hưởng nhất định đến sự phân bố của rễ cây. Khi thiếu nước, thực vật có xu hướng tăng cường hút nước từ các tầng đất sâu hơn bằng cách phát triển cấu trúc bộ rễ thông qua sự tăng trưởng của chiều dài rễ cái và sự tăng số lượng, lan rộng của các rễ bên [135]. Ở đậu tương, sự ức chế sinh trưởng ở chồi mạnh hơn, sinh khối của chồi giảm nhiều hơn so với rễ, dẫn đến tỷ lệ rễ/ chồi cao hơn trong điều kiện thiếu nước [49]. Để chống lại hạn hán, đậu tương có xu hướng phát triển hệ thống rễ bên lớn hơn, số lượng lông rễ nhiều hơn và đường kính xylem to hơn. Sự thiếu hụt đạm sẽ có thể xảy ra khi stress hạn làm giảm số lượng và khối lượng khô của nốt sần cây đậu tương. Khi đậu tương bị thiếu đạm, rễ ít phân nhánh, cây thấp còi, ít quả và hạt hơn cây khỏe mạnh, ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất [92].

Lá là bộ phận chính của cây, diện tích bề mặt lá có ảnh hưởng lớn đến quá trình quang hợp và sự phát triển của cây. Trong điều kiện khô hạn, hiện tượng giảm kích thước và số lượng lá, lá già hoá sớm đã được quan sát thấy ở nhiều loài thực vật [26]. Sự biến đổi hình thái, kích thước lá có vai trò quan trọng trong khả năng

chịu hạn của cây trồng. Đây là một cơ chế tránh hạn của cây vì giảm diện tích lá tác động tới sự thoát hơi nước khí khổng, giúp cân bằng lượng nước hấp thụ từ rễ và vận chuyển nước ở các bộ phận khác nhau của cây [22]. Tuy nhiên, stress hạn kéo dài dẫn tới khả năng quang hợp giảm, cây có ít năng lượng hơn để sinh trưởng và phát triển. Một hiện tượng hình thái lá khác dễ quan sát là hiện tượng cuộn lá do mất áp suất nước từ lớp biểu bì mặt trên của lá khi cây thiếu nước. Ở lúa mì, cây sẽ bị cuộn lá nặng nếu chịu tác động của hạn [166].

Giai đoạn phát triển của cây cũng rất dễ bị ảnh hưởng bởi sự khan hiếm nước. Stress hạn ảnh hưởng nghiêm trọng đến thời gian ra hoa, sự phát triển của hoa, quá trình thụ phấn, kết hạt và tạo quả [124]. Số hạt trên mỗi cây giảm nhiều nhất khi hạn xảy ra ở giai đoạn ra hoa. Khi đó, thời gian ra hoa bị rút ngắn, hoa tạo ra ít hơn, quả ít hơn và do đó, số lượng hạt trên mỗi cây ít hơn [147]. Trung bình một cây đậu tương cho 25- 40 quả, mỗi quả chứa trung bình 2,5 hạt. Khi khô hạn xảy ra ở giai đoạn làm đầy quả, số lượng quả có thể giảm tới 20% [98]. Những tác động của hạn có thể ảnh hưởng tiêu cực tới năng suất và có thể làm giảm 73–82% năng suất hạt trên mỗi cây đậu tương [165].

1.1.1.2. Tác động của hạn đến một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá

i) Tác động của hạn đến quang hợp

Quang hợp là một trong những quá trình quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển ở thực vật. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng và thời gian stress hạn mà quang hợp chịu tác động ở các mức độ khác nhau. Stress hạn làm giảm nồng độ CO₂ khuếch tán đến lục lạp, hạn chế sự trao đổi chất trong tế bào. Độ ẩm trong đất thấp làm tăng nồng độ muối, giảm thế năng của nước so với tế bào thực vật. Điều này dẫn đến giảm sức trương và ức chế sự phát triển của tế bào. Kết quả của sự mất nước ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme liên quan đến quá trình trao đổi chất và do đó làm rối loạn chức năng của bộ máy quang hợp [174]. Điều kiện stress hạn cấp tính cũng gây rối loạn hoạt động của enzyme Rubisco cùng các enzyme khác liên quan đến quá trình quang hợp và là nguyên nhân làm mất sắc tố quang

hợp [30].

Hiệu suất quang hợp, độ mở khí khổng, tốc độ thoát hơi nước giảm đáng kể trong thời gian hạn hán. Sự suy giảm diệp lục gây mất hiệu suất của hệ thống quang hoá II, thay đổi độ mở khí khổng và rối loạn cân bằng nước ở thực vật, từ đó làm giảm năng suất cây trồng [167]. Ngoài ra, một nguyên nhân khác làm suy giảm lượng diệp lục là do lượng O_2^- và H_2O_2 gia tăng khi thực vật chịu stress hạn, dẫn đến quá trình peroxy hóa lipid [85]. Theo Hao và cs (2013), hàm lượng diệp lục của cây đậu tương bị tác động stress hạn giảm 31% so với cây không bị stress [71].

Hạn hán gây rối loạn chuyển hóa, ức chế sản xuất các sản phẩm quang hợp, phá vỡ sự cân bằng cacbon trong đậu tương [49]. Sự suy giảm hiệu suất của quá trình quang hợp điều kiện khô hạn gây ra giảm tích lũy chất khô và tỷ lệ vỏ quả là nguyên nhân trực tiếp làm giảm năng suất của đậu tương [161].

ii) Tác động của hạn đến khả năng chống oxy hóa

Đối với các sinh vật hô hấp hiếu khí, oxy rất cần thiết để duy trì các hoạt động sống. Tuy nhiên, trong quá trình trao đổi chất nếu oxy không được oxy hoá hoàn toàn sẽ tạo ra một loạt các loại ROS, bao gồm superoxide (O_2^-), (H_2O_2), oxy đơn (1O_2), hydroxyl ($\cdot OH$) và gốc oxy hữu cơ ($RO\cdot$, $ROO\cdot$)... [104]. Ở điều kiện bình thường, thực vật luôn có sự duy trì sự cân bằng giữa ROS với hệ thống chống oxy hoá. Tuy nhiên, khi bị stress hạn, việc sản xuất và giải phóng ROS bị mất cân bằng. Stress hạn có thể gây ra sự gia tăng các ROS và làm cho các tế bào thực vật bị stress oxy hóa. Khi ROS vượt quá khả năng của hệ thống chống oxy hoá sẽ gây ra sự tích tụ ROS và phá hủy quá trình oxy hóa. Việc sản sinh ra các gốc tự do sẽ dẫn đến một loạt các tác động tế bào học có hại, như peroxy hóa lipid màng sinh học, biến tính protein, đứt gãy sợi DNA và cản trở quá trình quang hợp [169].

Hầu hết các hệ thống bảo vệ của tế bào thực vật được sử dụng để chống lại những tác động bất lợi của các gốc ROS do hạn hán gây ra. Trong trường hợp này, một hệ thống chống oxy hóa nhanh chóng, mạnh mẽ và hiệu quả đóng vai quan

trọng, then chốt, cung cấp khả năng chịu hạn cho thực vật [80]. Hệ thống này liên quan đến các hoạt động giải độc enzyme và phi enzyme, giúp giảm bớt và sửa chữa tổn thương do các gốc ROS gây ra. Việc tăng cường bộ máy chống oxy hóa giúp loại bỏ các gốc ROS, làm giảm sự rò rỉ điện giải và quá trình peroxy hóa lipid, từ đó duy trì sức sống và tính toàn vẹn của các bào quan và màng tế bào [62].

Khi hạn hán, các gốc ROS (O_2^- , OH^- , 1O_2 và H_2O_2) được tạo ra gây nên stress oxy hóa. Tỷ lệ tạo gốc ROS và hoạt động của enzyme chống oxy hóa điều chỉnh trạng thái oxy hóa khử của tế bào. Điều này có thể dẫn đến việc kiểm soát các gốc ROS gây tổn thương tế bào hoặc chết tế bào khi các gốc ROS vượt quá mức sinh lý. Nhiều nghiên cứu thực hiện trong điều kiện thiếu nước cho thấy sự tăng cường hoạt động của các enzyme chống oxy hóa quan trọng như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) và ascorbate peroxidase (APX) [32], [145]. Trong điều kiện stress hạn, APX tăng cường hoạt tính, tham gia thu hồi các gốc ROS bằng cách sử dụng ascorbate làm chất nền để kích thích sự chuyển đổi H_2O_2 thành H_2O [75]. Sự thay đổi hoạt động APX ở lá phổ biến hơn ở rễ vì APX hoạt động chủ yếu trong lục lạp, tế bào chất và là một enzyme quan trọng để loại bỏ H_2O_2 trong lục lạp [34]. Theo Wang và cs (2019), hoạt động của các enzyme SOD, POD, CAT và APX được thay đổi và đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cây hoa mallow chống lại tình trạng thiếu nước [159]. Ở cây đậu răng ngựa (*Vicia faba* L.), các enzyme SOD, CAT và POX cũng được kích thích hoạt động khi gặp stress hạn, giúp giảm mức độ ROS và giảm stress oxy hóa do hạn hán tạo ra [12]. Hàm lượng các enzyme CAT, POD và SOD trong lá tăng khi cây cam thảo (*Glycyrrhiza glabra* L.) gặp stress hạn giúp ngăn chặn tác hại của H_2O_2 [76].

iii) Tác động của hạn đến sự trao đổi khoáng

Tình trạng thiếu nước thường làm giảm khả năng hấp thụ nguồn khoáng trong đất của rễ, giảm tốc độ vận chuyển chất khoáng ở thân, cuối cùng làm giảm hàm lượng ion trong các mô khác nhau của cơ thể thực vật [91]. Khả năng hấp thụ kali (K) của cây giảm khi gặp điều kiện stress hạn. Sự suy giảm K này là do giảm khả

năng khuếch tán của K, giảm tốc độ thoát hơi nước và suy yếu hoạt động của các chất vận chuyển qua màng rễ [77]. Lượng K giảm cũng được tìm thấy ở cây hoa hải đường (*Malus hupehensis*) khi bị stress hạn [126]. Các gen mã hóa chất vận chuyển K^+ bị ức chế bởi sự thiếu hụt nước. Ở cây nho, các kênh K^+ bên trong được kích thích bởi một protein kinase- CIPK23; kênh K^+ này bị ức chế ở rễ nhưng được kích hoạt ở lá [41]. Về cơ bản, sự giảm lượng K^+ xảy ra trong lá vì sự khan hiếm nước làm rối loạn hoạt động của khí khổng và sự xáo trộn của tế bào, dẫn đến giảm quang hợp và cuối cùng là sản xuất sinh khối của cây [140]. Mức giảm nitơ (N) lá được coi là nguyên nhân chính gây ra sự suy giảm quang hợp và sự già hoá của lá [44]. Điều kiện stress hạn làm tăng sự tích tụ mangan (Mn), molybden (Mo), P, K, đồng (Cu), canxi (Ca) và kẽm (Zn) trong đậu tương [139].

1.1.2. Phản ứng của thực vật trong điều kiện stress hạn

Stress hạn có tác động mạnh tới cơ thể thực vật. Thiệt hại do hạn hán gây ra cho năng suất cây trồng hàng năm còn nhiều hơn thiệt hại do tất cả các mầm bệnh cộng lại [68]. Vì vậy, việc nghiên cứu làm sáng tỏ cơ chế chịu hạn và cải thiện khả năng chịu hạn ở thực vật có thể cung cấp các giải pháp mới cho an ninh lương thực trong tương lai. Hiểu được phản ứng của tín hiệu tế bào đối với tình trạng thiếu nước sẽ là chìa khóa để làm sáng tỏ các vấn đề nông nghiệp hiện đại. Trong các đợt hạn hán, thực vật thường chủ động duy trì cân bằng nước sinh lý bằng cách: (i) tăng khả năng hút nước của rễ từ đất đồng thời đóng khí khổng để giảm thất thoát nước và (ii) điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong các mô [130].

1.1.2.1. Sự phát triển bộ rễ

Ở nhiều loài cây trồng quan trọng trong nông nghiệp, hệ thống rễ là cơ quan cảm nhận đầu tiên với stress hạn. Mặc dù sự phát triển của chồi trên mặt đất bị ức chế, nhưng bộ rễ vẫn tiếp tục phát triển bên dưới đất và có sự thay đổi về hình thái, cấu trúc để tăng cường khả năng hấp thụ nước, muối khoáng. Rễ phản ứng với những thay đổi về độ ẩm của đất từ cấp độ tế bào đến toàn bộ hệ thống rễ chống lại sự khô hạn. Những thay đổi này có thể bắt nguồn đồng bộ từ việc phân chia tế bào

đến kéo dài và biệt hóa ở đỉnh rễ. Để hướng ẩm, hệ thống rễ phát triển và điều chỉnh cấu trúc theo các hướng khác nhau, có thể sâu hơn hoặc nông hơn về phía các mảng đất có độ ẩm cao hơn nhờ tín hiệu auxin [48].

Sự phân bố nước không đều trong đất cũng ảnh hưởng đến sự hình thành rễ bên. Do đó, các rễ bên sẽ được ưu tiên phát triển về phía nước có độ ẩm cao [23]. Ngược lại, nếu môi trường thiếu nước hoàn toàn sẽ ngăn cản sự hình thành rễ bên. Sự phát triển của rễ bên bị giảm chủ yếu là do ức chế sự hoạt hóa của các mô phân sinh của rễ bên.

Ngoài ra, rễ phát triển thông qua các cơ chế tương đối đơn giản nhưng thể hiện độ nhạy nổi bật với một loạt các thông số môi trường [107]. Sự phát triển cấu trúc hệ thống rễ có thể được xem chủ yếu là kết quả của ba quá trình: phát triển mô, phân nhánh và định hướng phát triển theo trọng lực. Tốc độ phát triển của rễ một phần được quyết định bởi sự giãn nở dị hướng của tế bào làm kéo dài cơ quan và ép phần chóp xuyên qua nền đất [25]. Việc phân nhánh của rễ làm tăng số lượng chóp rễ, tăng sự tiếp xúc với đất để hút nước [170].

Gao và Lynch (2016) khi nghiên cứu mối quan hệ tương quan giữa số lượng chóp rễ và áp lực hạn hán ở cây ngô nhận thấy, stress hạn đã ức chế sự phát triển số lượng rễ chùm. Các kiểu gen có ít rễ chùm thường phát triển hệ thống rễ dài hơn, có thể tiếp cận nước ở tầng đất sâu hơn [61]. Việc gia tăng chiều dài rễ được xem là cơ chế hữu hiệu nhằm tăng khả năng hút nước và chất khoáng từ đất, giúp cải thiện sinh khối trong cơ thể thực vật [180].

Sebastian và cs (2016) cho rằng, việc ức chế sự phát triển của rễ chùm sẽ hạn chế khả năng hút nước của hệ thống rễ, do đó nguồn tài nguyên này được bảo tồn trong đất lâu hơn. Điều này được chứng minh ở ngô trồng trong điều kiện hạn có kiểm soát; loại ngô đột biến *rtcs* thiếu rễ chùm duy trì trạng thái nước của lá và giữ được nhiều nước hơn trong đất so với loại hoang dại. Ở cây cỏ đuôi cáo (*Setaria viridis*), rễ phát triển sâu hơn do kết quả của sự thay đổi phát triển trong cấu trúc rễ, từ phát triển các nhánh có nguồn gốc rễ chính sang các nhánh có nguồn gốc rễ con

[141]. Việc tạm dừng sự phát triển rễ chùm trong đất khô có thể là kết quả của quá trình tiến hóa do đất khô cản trở sự xâm nhập của rễ [25].

1.1.2.2. Sự tích lũy các chất tan và tăng cường áp suất thẩm thấu

Sự tích lũy chất tan là cơ chế cơ bản để bảo vệ và điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong điều kiện stress hạn. Các chất hòa tan được tích lũy chủ yếu trong tế bào khi bị stress hạn mà không can thiệp vào hoạt động của các đại phân tử. Chúng là các hợp chất hydroxyl như oligosaccharide, polyhydric, sucrose hoặc các hợp chất chứa nitơ như proline, GB, polyamines và các hợp chất amoni [102]. Các chất này thường có khối lượng phân tử nhỏ, dễ hòa tan, ít độc với tế bào, có thể duy trì mức áp suất thẩm thấu bình thường, bảo vệ hoạt động của protein và cấu trúc màng tế bào,... Sự điều hòa thẩm thấu của các ion vô cơ có liên quan mật thiết đến bơm Na^+ , K^+ , H^+ , do đó làm thay đổi điện thế thẩm thấu của tế bào. Đồng thời, sự thay đổi nồng độ ion vô cơ sẽ gây ra sự thay đổi về hình thái và chức năng của tế bào [169].

Trong thời gian stress hạn, proline đóng một vai trò quan trọng và hoạt động như một hợp chất truyền tín hiệu để điều chỉnh hoạt động của ty thể. Proline ảnh hưởng đến sự tăng sinh của tế bào bằng cách kích hoạt các gen đặc biệt để chống lại các stress [148]. Proline có khả năng ngậm nước mạnh, vì vậy nó có thể đóng vai trò bảo vệ cấu trúc tế bào. Trong trường hợp cây bị tổn thương, proline tương tác với protein tạo thành khung kỵ nước nhằm ổn định và bảo vệ các đại phân tử sinh học và cấu trúc màng tế bào. Sự tích lũy proline giúp duy trì tính toàn vẹn của màng và ổn định các enzyme hoặc protein bằng cách giảm quá trình oxy hóa lipid, bảo vệ tế bào chống oxy hóa khử và loại bỏ các gốc tự do [146]. Proline có thể liên kết với protein để tạo thành một lớp màng bảo vệ với các phân tử nước trên bề mặt của protein. Sự hình thành màng bảo vệ hạn chế sự mất nước ra bên ngoài tế bào. Hơn nữa, màng bảo vệ có tác dụng bảo vệ tốt đối với protein và các đại phân tử sinh học khác, duy trì cấu trúc và hoạt tính cao của các đại phân tử sinh học. Đối với các protein bị biến tính dưới tác động của hạn, proline có thể cải thiện tính ưa

nước của các protein bị biến tính bằng cách kết hợp và giữ trạng thái hòa tan của các protein biến tính. Kết quả là tránh được sự ngưng kết của các protein đã biến tính cản trở hoạt động trao đổi chất của tế bào [169].

GB là một chất điều hòa thẩm thấu hiệu quả, không độc hại, có thể liên kết với cả vùng ưa nước và kỵ nước của các đại phân tử sinh học. Việc tăng cường tổng hợp và tích lũy GB trong điều kiện khô hạn giúp cải thiện khả năng chịu hạn của thực vật. Dưới áp lực hạn hán, GB có thể ổn định cấu trúc và tính chất của các đại phân tử sinh học, các enzyme quan trọng của chu trình dicarboxylic acid, các chất oxy hóa và hệ thống quang hóa..., có ý nghĩa sinh lý quan trọng trong việc duy trì quá trình hô hấp và quang hợp bình thường của thực vật [19].

Đường tan bao gồm glucose, fructose, sucrose và các loại carbohydrate khác là nguồn năng lượng và cacbon quan trọng, tham gia vào nhiều quá trình chuyển hóa trong cơ thể thực vật. Sự tích lũy đường tan làm giảm thế nước của tế bào, cải thiện khả năng hút nước và giữ nước của cây. Ngoài ra, chỉ có đường tan mới có thể thay thế các phân tử nước, hình thành liên kết hydro với protein để duy trì cấu trúc và chức năng cụ thể của protein khi bị stress hạn nghiêm trọng. Hơn nữa, sự gia tăng cacbohydrat hòa tan giữa các màng sinh học có thể tránh được sự sụp đổ trực tiếp của hệ thống màng sinh học [169]. Đường không khử, đặc biệt là đường disaccharide, trisaccharide, tetrasaccharide có tác dụng hỗ trợ duy trì tính toàn vẹn của màng. Đường mannitol hỗ trợ ổn định cấu trúc của các đại phân tử như glutathione, ferredoxin, thioedoxin, phosphoribulokinase và loại bỏ các gốc hydroxyl [27]. Tương tự, trehalose giúp ổn định lipid màng, protein và cấu trúc sinh học, cải thiện hoạt động quang hợp trong điều kiện khô hạn [89]. Cơ chế bảo vệ này là kết quả của việc hình thành các liên kết hydro giữa các chất thẩm thấu và đại phân tử; từ đó, tránh được việc tạo ra các liên kết hydro nội phân tử làm thay đổi không thể đảo ngược cấu trúc không gian của các đại phân tử.

1.1.2.3. Khả năng chống oxy hóa

ROS là các phân tử hóa học trong cấu trúc chứa oxy nguyên tử có khả năng

tham gia phản ứng oxy hóa khử mạnh hơn O_2 , gồm các dạng chính là peroxit, superoxit, gốc hydroxyl, oxy đơn và alpha-oxy [162]. ROS có thể được tạo ra trong cơ thể thực vật cả trong điều kiện bình thường và trong điều kiện stress. Các bào quan khác nhau của tế bào thực vật như lục lạp, ty thể, peroxisome, màng sinh chất và thành tế bào đều có thể là nơi sản xuất ra ROS. Lục lạp và peroxisome tạo ROS chính trong điều kiện có ánh sáng, trong khi ở ti thể, ROS được sản xuất chính trong điều kiện tối [63].

Việc tạo ra các gốc oxy ROS có tính hai mặt, một mặt, ROS gây hại cho cây trồng. ROS có thể phá hủy hệ thống màng sinh học của thực vật dẫn đến một loạt các rối loạn chức năng sinh học; phân hủy các phân tử sinh học; làm mất hoạt tính của enzyme, gây gián đoạn quá trình sinh trưởng và phát triển của cây thông; tương tác với purin, pyrimidine và deoxyribose trong phân tử DNA gây đứt gãy DNA, làm hỏng vật liệu di truyền. Mặt khác, ROS khi được tạo ra trong tế bào thực vật lại tham gia vào quá trình chống lại stress bên ngoài và điều hòa sự sinh trưởng và phát triển của cây. ROS cũng đóng vai trò điều tiết quan trọng trong phản ứng với stress phi sinh học. Hiện nay, ROS còn được coi là những phân tử điều hòa chính trong cơ thể thực vật với vai trò tín hiệu ban đầu do rối loạn chuyển hóa tế bào và các kích thích môi trường [162].

Để bảo vệ khỏi tác hại của ROS, thực vật cần có các hệ thống bảo vệ chống oxy hóa nội sinh, bao gồm các chất chống oxy hóa và các enzyme chống oxy hóa. Tác dụng hiệp đồng của chất chống oxy hóa và enzyme chống oxy hóa làm cho việc sản xuất và loại bỏ ROS trong tế bào ở trạng thái cân bằng động, giúp cây trồng thích nghi với stress hạn. Hệ thống chống oxy hóa phi enzyme trong thực vật chủ yếu bao gồm ascorbate, glutathione (GSH), vitamin E, mannitol, carotenoids và flavonoid. Những chất này có thể phản ứng trực tiếp với các gốc ROS hoặc xuất hiện dưới dạng chất nền của các enzyme trong cơ chế chống oxy hóa. Ngoài ra, một số phân tử nhỏ như vitamin cũng tham gia vào việc loại bỏ các gốc oxy tự do và ngăn chặn quá trình peroxy hóa lipid. Sự biểu hiện quá mức của các protein chống oxy hóa

này có thể làm giảm đáng kể hàm lượng H_2O_2 ở thực vật sau khi xử lý stress phi sinh học, từ đó cải thiện khả năng chống chịu stress của cây trồng chuyển gen [157].

Các enzyme liên quan đến bảo vệ chống oxy hóa trong thực vật chủ yếu bao gồm SOD, CAT, APX, DHAR, MDHAR và POD. Trong đó, SOD có chức năng chính loại bỏ O_2^- và có thể chuyển đổi O_2 thành H_2O_2 [63]; CAT, POD, APX và DHAR chịu trách nhiệm loại bỏ H_2O_2 ; guaiacol peroxidase (GPX) loại bỏ ROS của quá trình chuyển hóa lipid và alkyl peroxit [114].

Một vài năm trở lại đây, quan điểm về ROS đã thay đổi. Từ quan điểm bị coi sản phẩm độc hại phải loại bỏ để bảo vệ tế bào khỏi tác động bất lợi sang quan điểm là cơ chế trung tâm sinh học thực vật, một bộ truyền tín hiệu trung gian quan trọng kích hoạt các con đường thích nghi với stress phi sinh học. Nếu tế bào có đủ năng lượng, nồng độ ROS được cân bằng sẽ điều chỉnh sự trao đổi chất và xác định phản ứng thích nghi thích hợp trong điều kiện khô hạn. ABA, ROS, MAPK và Ca^{2+} có thể coi là yếu tố chính tham gia vào việc kích hoạt các dòng tín hiệu khác nhau, tạo nên khả năng chịu đựng với một loạt các stress phi sinh học [157].

Trong số các ROS, H_2O_2 được sử dụng như một phân tử tín hiệu quan trọng giúp tế bào phản ứng với các áp lực khác nhau nhờ đặc tính ổn định, thời gian bán hủy dài và khả năng khuếch tán mạnh. Phương pháp chuyển gen nhằm mục tiêu sản xuất và loại bỏ ROS có thể giúp giải mã chức năng và vai trò sinh học của H_2O_2 trong điều kiện stress hạn [157]. Việc chọn lọc các cây trồng nhằm nâng cao khả năng chống oxy hóa giúp tăng khả năng chống chịu trong điều kiện stress hạn. Cây mía có kiểu gen *RB867515* có bộ máy chống oxy hóa mạnh biểu hiện khả năng chịu hạn kéo dài [158]. Gen *BdWRKY36* kích thích phiên mã các gen liên quan đến stress, giảm thất thoát chất điện giải, loại bỏ ROS và tăng lượng diệp lục, thể nước của cây và các hoạt động của enzyme chống oxy hóa giúp tăng cường khả năng chịu hạn [151]. Ở ba loài thuộc họ hoa môi (*Linderniaceae*), việc biểu hiện gen *LEA* làm giảm hoạt động quang hợp, thúc đẩy hệ thống bảo vệ chống oxy hóa giúp cải thiện khả năng chống chịu với stress hạn [84].

1.1.2.4. Sự điều hoà các hormone

Các phytohormone (bao gồm gibberellins, cytokinin, auxin, ABA và ethylene) điều chỉnh và kiểm soát tất cả các khía cạnh của sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Các hormone thực vật này có liên quan đến khả năng chịu hạn [155]. Ở thực vật, nồng độ gibberellin, cytokinin và auxin giảm khi thiếu nước trong khi ethylene và ABA có xu hướng tăng lên. ABA kích hoạt các cơ chế tín hiệu đa dạng làm tăng khả năng chịu hạn của thực vật [31]. ABA thúc đẩy hiện tượng mao dẫn của rễ làm tăng khả năng hấp thụ và vận chuyển nước ở thực vật [119]. Bên cạnh việc kích thích sự đóng mở của khí khổng, cấu trúc rễ và điều hòa quang hợp, các gen cảm ứng ABA mã hóa các protein liên quan đến hạn hán như mất nước, enzyme chống oxy hoá, protein điều hòa và enzyme truyền tín hiệu phospholipid có thể cải thiện khả năng chịu hạn [50]. ABA làm tăng sản xuất các gốc superoxide và H_2O_2 , tăng cường hoạt động của các enzyme chống oxy hóa. Do đó, sự tăng cường biểu hiện gen do ABA gây ra có thể đóng vai trò như một tín hiệu cải thiện khả năng chịu hạn. ABA giảm stress hạn và tăng khả năng chống chịu của lúa mì bằng cách cải thiện chiều dài thân và sinh khối thực vật, làm giảm hàm lượng H_2O_2 và malondialdehyde (MDA)- một dấu hiệu của stress oxy hóa [99].

Sức trương của tế bào kiểm soát độ mở của khí khổng, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình trao đổi khí và thoát nước từ lá. ABA có vai trò trung tâm trong việc điều chỉnh quá trình đóng khí khổng thông qua tổng hợp các loại ROS. Sự tổng hợp này phải được kiểm soát bằng các chất chống oxy hóa để giữ cho nồng độ ROS giảm đến mức không gây hại trong tế bào. Flavonol là chất chuyển hóa thực vật hoạt động như chất chống oxy hóa để loại bỏ ROS và do đó điều chỉnh quá trình đóng khí khổng; Ethylene gây ra sự tích lũy flavonol bảo vệ các tế bào thông qua ethylene-insensitive protein 2 (EIN2). Sự tích lũy flavonol dưới tác động của ethylene trong các tế bào bảo vệ có thể loại bỏ các loại ROS và điều chỉnh độ đóng mở khí khổng [163].

Ngoài ra, jasmonic acid cũng rất cần thiết để giảm thiểu stress hạn. Tuy nhiên,

jasmonic acid thường kết hợp với các hormone khác để tăng cường khả năng sống sót của thực vật trong điều kiện thiếu nước. Jasmonic acid cải thiện khả năng chịu hạn ở thực vật bằng nhiều cách khác nhau, bao gồm kích thích sự phát triển của rễ, giảm tích lũy ROS và thúc đẩy quá trình đóng khí khổng [155]. Điều này cũng được thể hiện trong nghiên cứu của Fang và cs (2016) về tăng cường biểu hiện gen *VaNAC26* liên quan đến tổng hợp jasmonic acid làm tăng khả năng loại bỏ ROS, kích thích sự đóng khí khổng và tăng trưởng rễ, do đó nâng cao khả năng chịu hạn [54]. Trong đậu tương, methyl jasmonate (MeJA) giúp tăng cường khả năng chịu hạn và cải thiện sự phát triển của cây trồng [105].

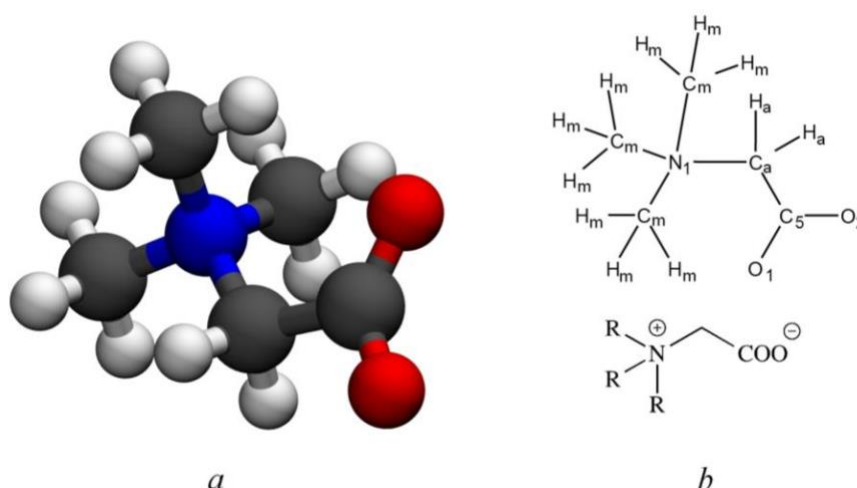
Auxin là một phytohormone liên quan đến nhiều quá trình tăng trưởng thực vật và phản ứng với các điều kiện stress. Trong điều kiện stress hạn, auxin điều chỉnh đáng kể một số chất chuyển hóa cacbon bao gồm amino acid, acid hữu cơ, đường... Auxin có thể tham gia tích cực vào khả năng chống chịu stress do hạn hán, thông qua điều chỉnh cấu trúc rễ, biểu hiện gen đáp ứng ABA, chuyển hóa ROS và cân bằng nội môi [144].

1.2. GLYCINE BETAINE, CHOLINE OXIDASE

1.2.1. Glycine betaine

1.2.1.1. Cấu trúc và hoạt động của glycine betaine

Glycine betaine (2-N, N, N-trimethylammonio acetat hoặc N, N', N'' - trimethylglycine) là một dẫn xuất được thay thế hoàn toàn N-metyl của glycine (Hình 1.1). GB là hợp chất amoni bậc bốn có khối lượng phân tử thấp, lưỡng cực và trung tính về điện ở pH sinh lý [43]. GB là hợp chất không độc, không màu, không mùi, không vị, có khả năng hòa tan cao và độ nhớt thấp. GB có trong nhiều loài thực vật, đặc biệt là các loài thực vật hoang dại trồng dưới các điều kiện stress. Chính vì thế, GB trở thành một trong những chất hòa tan tương thích được nghiên cứu nhiều nhất nhằm cải thiện khả năng chịu đựng với stress phi sinh học ở thực vật [36].



Hình 1.1. Cấu trúc không gian (a) và cấu trúc phân tử (b) của GB [56]

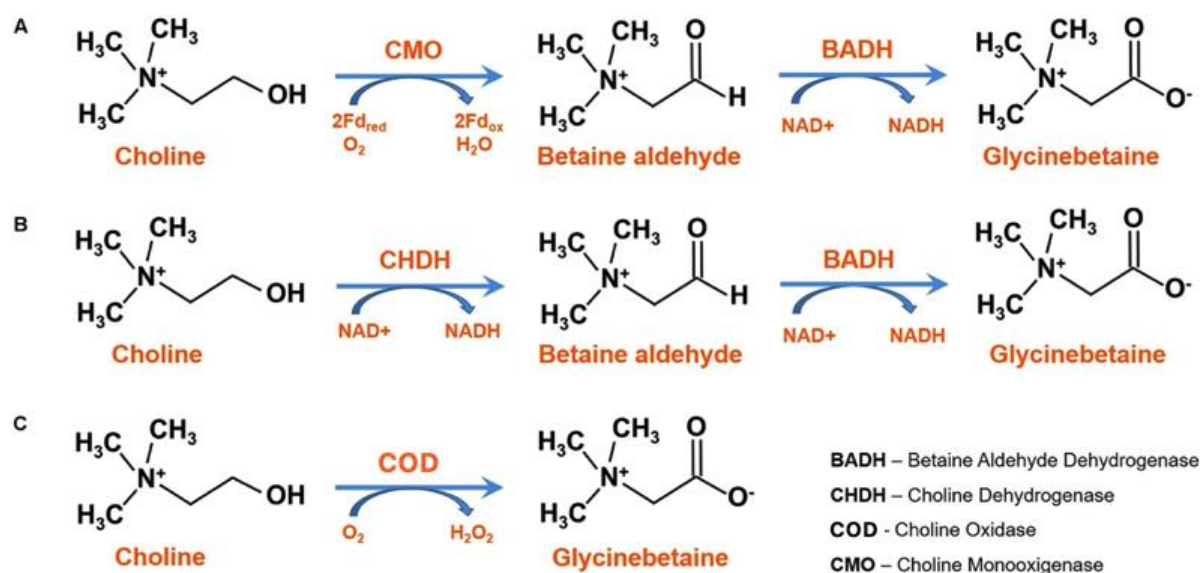
GB thường được gọi là chất thẩm thấu, chất bảo vệ thẩm thấu hoặc chất hòa tan tương thích. GB cũng có thể được coi là chất kích thích sinh học, được sử dụng ở nồng độ thấp để thúc đẩy sự phát triển của cây trồng, tăng khả năng chống chịu stress phi sinh học và nâng cao sản lượng cây trồng. Các loài khác nhau, các cơ quan khác nhau trong cơ thể thực vật có mức độ tích lũy GB không giống nhau. Ở nhiều loài thực vật, lượng GB được sản xuất ở mức độ thấp, nhưng cũng có thể tích lũy lượng GB lớn hơn khi bị stress phi sinh học; sự tích lũy tự nhiên đủ để cải thiện tác động tiêu cực của tình trạng mất nước gây ra bởi những vấn đề môi trường khác nhau (những loài thực vật này được gọi là sinh vật tích lũy GB tự nhiên). Tuy nhiên, ở nhiều loài khác như lúa, khoai tây, cà chua, thuốc lá..., GB không được phát hiện trong điều kiện trong điều kiện stress hoặc không stress (sinh vật không tích lũy tự nhiên) [37].

1.2.1.2. Các con đường sinh tổng hợp glycine betaine

GB được tổng hợp thông qua hai con đường phổ biến, từ tiền chất choline hoặc glycine. Con đường tổng hợp thứ nhất ở thực vật, GB được tổng hợp bắt đầu từ choline. Quá trình sinh tổng hợp choline được xúc tác chủ yếu nhờ phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT). Sau đó, choline được đưa vào lục lạp và trải qua hai bước phản ứng oxy hóa. Đầu tiên, choline bị oxy hóa

thành betaine aldehyde, một chất trung gian độc hại, sau đó tiếp tục được oxy hóa thành GB nhờ xúc tác của choline monooxygenase (CMO), một protein hòa tan phụ thuộc ferredoxin có vị trí hoạt động kiểu Rieske [2Fe-2S] khu trú trong lục lạp hoặc các bào quan khác. Tiếp theo, ở bước oxy hóa thứ hai, betaine aldehyde sẽ được chuyển thành GB dưới tác dụng của betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) (Hình 1.2A). BADH có thể phụ thuộc NAD^+ hoặc NADP^+ . Ở thực vật, BADH có hoạt tính cao hơn với NAD^+ [57]. BADH thuộc siêu họ của aldehyde dehydrogenase có tác dụng không đặc hiệu đối với các chất nền aldehyde khác. Điều này giải thích cho sự hiện diện của BADH trong thực vật không tích lũy GB hoặc trong các cơ quan của thực vật không chứa GB [129].

Khác với thực vật, động vật và nhiều vi khuẩn lại sử dụng choline dehydrogenase (CHDH) làm enzyme xúc tác cho bước đầu tiên của quá trình oxy hóa choline thành betaine aldehyde; trong khi ở bước oxy hoá thứ hai, enzyme tham gia chuyển betaine aldehyde thành GB vẫn là BADH (Hình 1.2B).



Hình 1.2. Các con đường sinh tổng hợp GB

(A) ở thực vật; (B) ở động vật và nhiều vi khuẩn;

(C) ở *Arthrobacter globiformis* và *Arthrobacter pascens* [18]

Trong khi đó, vi khuẩn *Arthrobacter globiformis* và *Arthrobacter pascens* chỉ sử dụng một enzyme duy nhất là choline oxidase mã hóa bởi một gen đơn *codA* xúc tác quá trình oxy hóa trực tiếp bốn điện tử của choline thành GB (Hình 1.2C). Choline oxidase chứa flavin adenine dinucleotide (FAD) được liên kết cộng hóa trị và hoạt động qua hai phản ứng chuyển hydrua, hai phản ứng giảm flavin và các bước giới hạn tốc độ [51].

Con đường tổng hợp thứ hai sử dụng glycine thay vì choline để tổng hợp GB. Con đường tổng hợp này chỉ được tìm thấy ở vi khuẩn quang dưỡng *Actinopolyspora halophila* và *Ectothiorhodospira halochloris* [14]. Các chiết xuất tế bào của cả *E. halochloris* và *A. halophila* đều có hoạt tính methyltransferase trên glycine và AdoMet (S-Adenosyl methionine) đóng vai trò tạo nhóm methyl. Quá trình tổng hợp betaine từ glycine gồm ba bước methyl hoá. Đầu tiên glycine được methyl hóa thành sarcosine, sau đó tiếp tục được methyl hóa thành dimethylglycine và betaine.

Ngoài hai con đường trên, GB cũng có thể được tổng hợp từ serine thông qua, 1) con đường glycerate không phosphoryl hóa, 2) con đường phosphoryl hóa phospho-hydroxypyruvate [81] hoặc 3) con đường glycolat phản ứng quang sinh nhiệt do muối gây ra [33]. Serine là tiền chất của phospho-ethanolamine qua ethanolamine. Sau đó, quá trình phosphoryl hóa ethanolamine được xúc tác bởi choline/ ethanolamine kinase (CEK).

Từ các con đường sinh tổng hợp GB ở các đối tượng sinh vật khác nhau nêu trên nhận thấy, con đường sinh tổng hợp GB ở *A. globiformis* và *A. panescens* là đơn giản nhất. Từ tiền chất choline được chuyển hóa thành GB chỉ cần xúc tác bởi một enzyme duy nhất, choline oxidase được mã hóa bởi gen *codA*. Vì vậy, gen *codA* mã hoá enzyme choline oxidase đã trở thành mục tiêu nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học nhằm cải thiện khả năng chống lại các stress thâm thấu [133]; sản xuất các cảm biến để xác định choline và các dẫn xuất trong chất lỏng sinh học [138].

1.2.1.3. Vai trò của glycine betaine đối với tính chống chịu của thực vật

GB là một trong những chất hoà tan chính tham gia vào nhiều cơ chế bảo vệ khác nhau trong cơ thể thực vật để chống lại các rối loạn liên quan đến stress phi sinh học [19]. GB là một chất chuyển hóa lưỡng tính, tan nhiều trong nước, trung tính về điện ở nhiều độ pH [43]. GB không chỉ hoạt động như một chất điều hoà thẩm thấu, mà còn hoạt động như một ion lưỡng tính, có thể tương tác với cả vùng ưa nước và kỵ nước của phức hợp protein và màng. Điều này góp phần ổn định và duy trì tính toàn vẹn về cấu trúc, chức năng của đại phân tử và bảo vệ chúng trước những tác hại của ROS [69]. GB có thể làm giảm lưu lượng kali do muối tạo ra bằng cách điều chỉnh các kênh ion [164]; tăng cường hoạt động của enzyme màng sinh chất H^+ -ATPase, tăng sự hấp thu phosphate và điều chỉnh cân bằng nội môi [93]. Hơn nữa, GB còn có thể duy trì sự ổn định của các đại phân tử, đảo ngược sự tập hợp và tập hợp sai mà không làm ảnh hưởng đến các hoạt động chức năng cơ bản của protein [88].

GB tích lũy ở nồng độ cao không những không gây cản trở chức năng của tế bào chất mà còn có tác dụng đảm bảo tính ổn định cấu trúc và chức năng của các đại phân tử. Sự xuất hiện của GB như một yếu tố quyết định tới khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi ở cây trồng. Dưới áp lực của nhiệt độ cao, cây trồng tích lũy GB để kích thích tổng hợp protein D1, hỗ trợ việc sửa chữa hệ thống quang hoá II bị ảnh hưởng bởi ánh sáng [37]. Hơn nữa, sự tích tụ của GB cải thiện tốc độ quang hợp trong điều kiện stress. Trong thời gian khô hạn, nồng độ GB khu trú trong lục lạp gia tăng đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh lục lạp, bảo vệ màng thylakoid, dẫn đến duy trì hiệu quả quang hợp và tính toàn vẹn của màng [14]. GB có tác dụng ổn định cấu trúc bậc bốn của các enzyme và protein phức tạp, phát triển các thành phần khác nhau của bộ máy quang hợp [143]; duy trì tính ổn định của màng ở nhiệt độ cực đoan [55]; giảm nhẹ tác hại do ROS [37].

Một số nghiên cứu đã giải thích mối quan hệ giữa GB với khả năng chống

chịu stress phi sinh học ở các cây trồng khác nhau thông qua việc sử dụng GB ngoại sinh hoặc tích lũy tự nhiên. Kỹ thuật sử dụng GB ngoại sinh có thể nâng cao khả năng chống chịu stress phi sinh học và tăng năng suất cây trồng. Một số loài cây trồng ít hoặc không tích lũy GB, khi bổ sung GB ngoại sinh qua mô lá sẽ được hấp thu và vận chuyển đến các cơ quan, góp phần giảm thiểu các tác động tiêu cực do stress phi sinh học, từ đó nâng cao năng suất và sự phát triển của cây trồng [55].

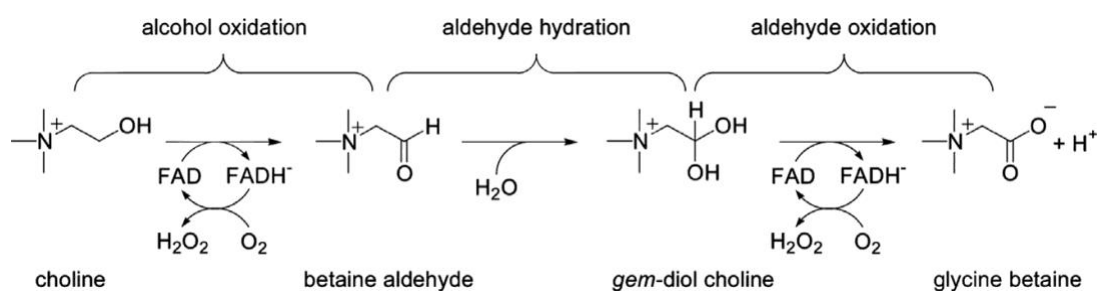
Cây đậu tương có lượng GB tích lũy thấp, trung bình khoảng 5 $\mu\text{mol/g}$ KLK, việc sử dụng GB trên lá ngoại sinh cho thấy sự tích lũy GB tăng gấp 12 lần (60 $\mu\text{mol/g}$ KLK). Điều này dẫn đến sự gia tăng tổng thể về diện tích lá, năng suất quang hợp, khả năng cố định nitơ và năng suất hạt. Cây đậu tương trồng ngoài đồng ruộng khi được bổ sung GB qua lá cho thấy, hiệu suất sinh sản và diện tích lá tăng lên, đi kèm với việc tăng tốc độ quang hợp và tăng cường cố định N_2 [131]. Tuy nhiên, vai trò chính xác của các chất hòa tan, bao gồm cả GB, trong khả năng chống chịu stress phi sinh học phần lớn vẫn chưa được biết hết [64].

1.2.2. Choline oxidase

1.2.2.1. Cấu trúc và hoạt động của choline oxidase

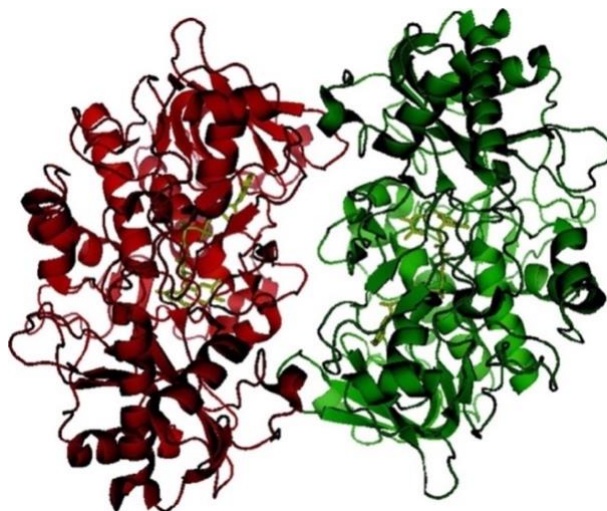
Choline oxidase từ *Arthrobacter globiformis* lần đầu tiên được tinh chế bởi Ikuta năm 1977. Enzyme này là một flavoprotein, xúc tác quá trình oxy hóa bốn electron của choline thành GB (N, N, N-trimethylglycine, betaine) với sản phẩm trung gian là betaine aldehyde và chất nhận điện tử cuối cùng là oxy phân tử [82].

Choline oxidase xúc tác cho quá trình oxy hóa bốn điện tử qua hai bước trung gian flavin của choline thành GB (Hình 1.3). Trong bước đầu tiên, choline bị oxy hóa thành betaine aldehyde, O_2 bị khử thành hydro peroxide (H_2O_2). Bước thứ hai, betaine aldehyde liên kết với enzyme được hydrat hóa tạo ra *gem*-diol choline, sau đó được oxy hóa thành GB [58].



Hình 1.3. Quá trình oxy hóa choline thành GB xúc tác bởi choline oxidase [58]

Choline oxidase trong dung dịch tồn tại dưới dạng homodimer, kích thước khoảng 120 kDa, không phụ thuộc vào nồng độ, được chứng minh bằng sắc ký và điện di trên gel polyacrylamide không biến tính [52]. Giao diện dimer bao gồm hai bộ sáu tiếp điểm giữa các tiểu đơn vị giống hệt nhau nằm giữa các góc có điện tích trái dấu ở các cạnh bên ngoài của giao diện (Hình 1.4). Phần trung tâm của giao diện dimer gồm tập hợp các góc không phân cực hoạt động như cổng cho phép tiếp cận cơ chất và ra sản phẩm đến và đi từ vị trí hoạt động của enzyme [138].

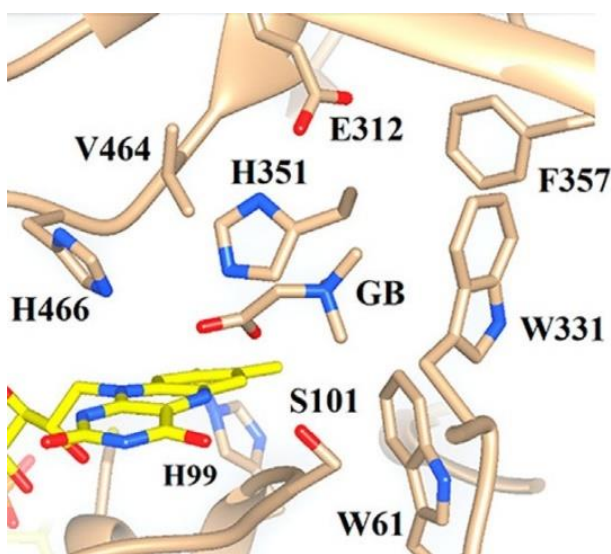


Hình 1.4. Cấu trúc không gian của choline oxidase độ phân giải 1,86 Å [59]

Màu đỏ và xanh lục: cấu trúc phân tử hai tiểu đơn vị giống hệt nhau của enzyme; màu vàng: các phân tử FAD trong mỗi tiểu đơn vị.

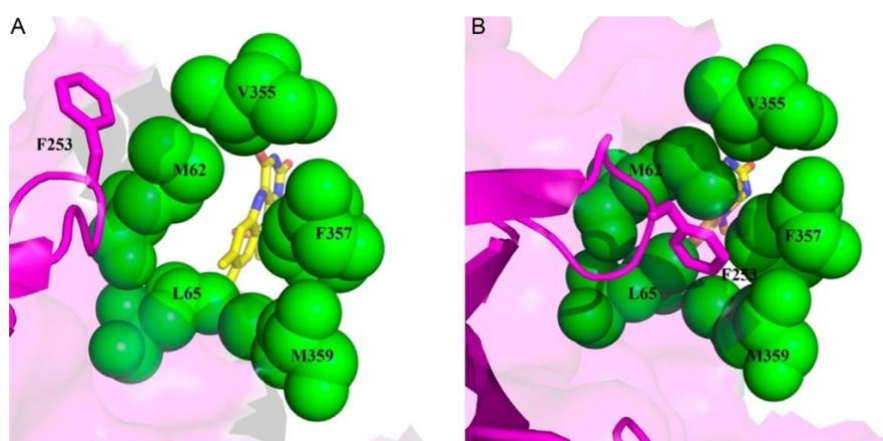
Nếp gấp protein ở mỗi tiểu đơn vị của choline oxidase tương tự như của các sản phẩm oxy hóa glucose-metanol-choline khác, với một nếp gấp p-

hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH). Enzyme có cấu trúc tổng thể hai miền điển hình với miền liên kết FAD, được hình thành bởi các gốc 1–159, 201–311, 464–527 và một miền liên kết cơ chất được hình thành bởi các gốc 160–200, 312–463. Flavin được bao bọc kín trong protein và liên kết cộng hóa trị với nguyên tử H99 Nε2 thông qua methyl C8. Gốc phosphat của FAD tiếp xúc gần với nếp gấp ²⁰GXGXXG²⁵ Rossman ở đầu N tận cùng của protein. Trong miền liên kết với cơ chất, một tấm β sáu sợi đối song song tạo thành đáy của vị trí hoạt động, ở phía bên kia là ba xoắn α nhô ra. Khoang vị trí hoạt động của choline oxidase bao gồm các gốc của cả hai miền liên kết. Các gốc E312, W331, H351, F357 trong miền liên kết cơ chất và các gốc W61, S101, W331, V464, H466, N510 trong miền liên kết FAD (Hình 1.5) [138].



Hình 1.5. Vị trí hoạt động của choline oxidase kiểu đại với sản phẩm hoạt động liên kết với GB [150]

Que màu vàng: các nguyên tử C của FAD; que màu nâu: các nguyên tử của các phần protein được chọn và của GB; màu xanh lam: nguyên tử N; màu đỏ: nguyên tử O. GB: glycine betaine; ngoại trừ W61 và W331, amino acid khác: đặc điểm đã đột biến trước đây.



Hình 1.6. Lối vào vị trí hoạt động của choline oxidase [137]

(A) Cấu trúc mở vòng 250–255 của choline oxidase kết hợp với GB; (B) Dạng khép kín của choline oxidase trong phức hợp với dimethyl sulfoxide; Hình cầu xanh lục: các chuỗi bên M62, L65, V355, F357, M359 của tiểu đơn vị B; màu đỏ: bề mặt của tiểu đơn vị A tại mặt phân cách dimer; các que màu đỏ: chuỗi bên F253 của tiểu đơn vị A; bảng quy ước màu mô hình phân tử với cacbon màu vàng: FAD.

Khoang vị trí hoạt động của choline oxidase không thể nhìn thấy từ bề mặt phân tử của protein, được tách biệt khỏi dung môi và isoalloxazine của FAD. Lối vào vị trí hoạt động của choline oxidase được kiểm soát bởi một số chất bám bề mặt nằm ở trung tâm giao diện của các tiểu đơn vị trong enzyme dimeric. Quá trình tạo cổng kết nối thông qua sự tương tác giữa các chuỗi bên M62, L65, V355, F357, M359 cho phép cơ chất choline tích điện dương trượt đến khoang vị trí hoạt động của choline oxidase tích điện âm (Hình 1.6) [59].

1.2.2.2. Vai trò của choline oxidase trong kỹ thuật di truyền sinh tổng hợp glycine betaine

Vai trò sinh lý của choline oxidase là sinh tổng hợp GB, một trong số ít các chất hòa tan tương thích được tế bào sử dụng để duy trì áp suất thẩm thấu. Enzyme này đóng vai trò quan trọng bởi vì khi tích lũy hàm lượng cao GB trong tế bào sẽ giúp tế bào chống lại sự khử nước và hiện tượng co nguyên sinh trong điều kiện môi trường bất lợi [28].

Cho đến nay, phần lớn các con đường tổng hợp GB đã công bố đều bắt đầu từ choline và tiến hành thông qua các phản ứng liên quan đến một hoặc hai enzyme để oxy hóa choline thành GB. Trong đó, con đường phản ứng một enzyme xảy ra trong vi khuẩn đất *A. globiformis* và *A. pascens* được xúc tác bởi choline oxidase (COD). Phản ứng hai enzyme trong lục lạp của thực vật bậc cao do xúc tác của choline monooxygenase (CMO) phụ thuộc ferredoxin và BADH phụ thuộc NAD^+ . Và một phản ứng hai enzyme khác được xúc tác bởi choline dehydrogenase (CDH) phụ thuộc NAD^+ và BADH trong tế bào động vật có vú và ở vi sinh vật (*E. coli*). Vì vậy, các nhà nghiên cứu cần chọn ra một con đường tổng hợp GB tối ưu nhất để đưa vào các sinh vật không tích lũy GB. Con đường COD rõ ràng có lợi thế hơn con đường CDH/ BADH và CMO/ BADH vì biến nạp đơn lẻ với một gen liên quan sẽ tạo ra con đường từ choline thành GB mà không cần bất kỳ một đồng yếu tố nào cho quá trình xúc tác. Trong thực tế, trong các nghiên cứu về vi khuẩn lam và thực vật khác nhau, kỹ thuật di truyền với *codA* của *A. globiformis* và *cox* gen s của *A. pascens* đã được chứng minh là thành công nhất [175].

Choline oxidase đã được sử dụng để tạo các cây trồng chuyển gen nhằm nâng cao khả năng chống chịu điều kiện bất lợi và tăng cường áp suất thẩm thấu ở các cây trồng quan trọng về kinh tế nhưng lại thiếu các con đường sinh tổng hợp hiệu quả GB. Các cây trồng chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase của vi khuẩn đã cho thấy khả năng chống chịu tốt đối với các loại stress phi sinh học khác nhau như, nhiệt độ thấp [72], nồng độ muối cao [160], ánh sáng mạnh [16], hạn hán [171], stress oxy hóa [121],... so với đối chứng. Các cây trồng như cà chua, lúa, khoai tây là đối tượng của những nghiên cứu này. Ngoài ra, một ứng dụng quan trọng khác của choline oxidase là trong kỹ thuật cảm biến sinh học nhằm phát hiện choline trong dịch huyết thanh học, thực phẩm và phát hiện các enzyme khác có liên quan đến y tế như acetylcholine và phospholipase D [39].

1.2.2.3. Đặc điểm của gen mã hoá *codA*

Một trong những phương pháp tiếp cận công nghệ sinh học để tăng khả năng

chịu hạn ở thực vật là kỹ thuật chuyển gen nhằm tăng cường trao đổi chất của các chất thẩm thấu. Quá trình sinh tổng hợp các chất có hoạt tính thẩm thấu trong thực vật bằng kỹ thuật di truyền có nhiều cách, trong đó, việc đưa vào bộ gen của thực vật một gen ngoại lai *codA* mới từ vi khuẩn *A. globiformis* mã hóa choline oxydase (COD) không tồn tại trong cơ thể thực vật là cách đơn giản và hiệu quả. Gen *codA* mã hoá choline oxydase chịu trách nhiệm tổng hợp GB từ tiền chất choline bên trong lục lạp của tế bào thực vật. Vì vậy, người ta thường hướng enzyme này vào lục lạp, bằng cách bổ sung vào trình tự của gen vi khuẩn trình tự tín hiệu hướng protein vào lục lạp từ một trong các gen thực vật chịu trách nhiệm vận hành bộ máy quang điện [67].

Tuy nhiên, trong các thí nghiệm biến nạp, các gen ngoại lai được tích hợp vào hệ gen thực vật thường biểu hiện yếu do một số nguyên nhân như nổi bất thường, đa bội sớm. Vì vậy, cần phải sửa đổi vị trí kết hợp nucleotide của các gen ngoại lai (theo quy luật, với hàm lượng A + T dư thừa) để biểu hiện thành công. Các gen từ vi khuẩn thường có hàm lượng G + C rất cao, trong quá trình chuyển nạp vào hệ gen của thực vật có thể bị metyl hóa mạnh, làm giảm hoạt tính của chúng trong các thế hệ tiếp theo. Do đó, trình tự nucleotide nhân tạo phải được thiết kế sao cho hàm lượng A + T được tăng lên khi xem xét việc sử dụng các codon thường gặp nhất trong gen của cả cây hai lá mầm và cây một lá mầm [67].

Gen *codA* ở vi khuẩn *A. globiformis* dài 1641 bp và mã hóa chuỗi polypeptit 547 amino acid. Trình tự nucleotide này được bão hòa bởi hàm lượng G + C cản trở đáng kể sự dẫn truyền của phản ứng chuỗi polymerase và trình tự tiếp theo do phần lớn cấu trúc kẹp tóc có khả năng chống nóng chảy [67]. Vì vậy, để thiết kế mã di truyền cho trình tự gen *codA* tổng hợp nhân tạo phù hợp với sự biểu hiện gen trong hệ thống tế bào thực vật cần dựa vào trình tự gen *codA* mã số AY304485 được công bố trên Genbank. Đồng thời, bổ sung vào đầu 5' của trình tự gen nhân tạo *codA* một đoạn nucleotide dài 216 bp transit peptide- TP (mã hóa protein vận chuyển tiểu đơn vị Rubisco ở cây thuốc lá) để vận chuyển enzyme vào trong lục

lap. Đầu 3' của gen nhân tạo *codA* được bổ sung một đoạn nucleotide dài 30 bp mã hóa kháng nguyên *cmv* được sử dụng để kiểm tra sự hiện diện của protein *codA* tái tổ hợp ở cây chuyển gen bằng kỹ thuật lai western blot. Như vậy, gen *codA* được tổng hợp nhân tạo có chiều dài 1887 bp (216 bp *TP*+ 1641 bp *codA* + 30 bp *cmv*). Trình tự nucleotide của gen *codA* tổng hợp nhân tạo với trình tự nucleotide của gen *codA* gốc mã số AY304485 có độ tương đồng 72,6%. Trình tự amino acid của protein được mã hóa bởi gen *codA* tổng hợp nhân tạo và protein được mã hóa bởi gen *codA* gốc mã số AY304485 giống nhau (Phụ lục 1). Chính vì thế, chức năng của choline oxidase mã hóa bởi gen *codA* tổng hợp nhân tạo không bị thay đổi [79].

1.3. NÂNG CAO KHẢ NĂNG CHỊU HẠN Ở ĐẬU TƯƠNG BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN

1.3.1. Cây đậu tương

Đậu tương bắt nguồn từ Mãn Châu, Trung Quốc, từ một loại đậu tương dại, thân mảnh, dạng dây leo sau đó lan truyền ra khắp thế giới. Hiện nay, đậu tương được trồng nhiều nhất ở Châu Mỹ, tiếp đến là Châu Á. Đậu tương là loại cây thực phẩm quan trọng được trồng lấy hạt sau lúa mì, lúa nước và ngô. Ở Việt Nam, đậu tương được trồng ở các khu vực: Đông Nam Bộ (26,2%), miền núi Bắc Bộ (24,7%), đồng bằng Sông Hồng (17,5%), đồng bằng Sông Cửu Long (12,4%) và khu vực đồng bằng ven biển miền Trung, Tây Nguyên [3].

Cây đậu tương thuộc bộ Phaseoleae, họ đậu Fabaceae, họ phụ cánh bướm Papilionoideae, chi *Glycine* với tên khoa học là *Glycine max*. Dựa vào đặc điểm hình thái, sự phân bố địa lý và số lượng nhiễm sắc thể, chi *Glycine* còn có chi phụ *Soja*. Chi *Glycine* gồm 7 loài, chi *Soja* gồm 2 loài trong đó loài đậu tương trồng là *Glycine max*. Đậu tương trồng ở Việt Nam thuộc giống phụ *G.Soja*, chi *Glycine* có nguồn gốc địa phương hoặc nhập nội [4].

Đậu tương là cây hai lá mầm thân thảo, tự thụ phấn. Thân cây có nhiều lông nhỏ, chiều cao từ 0,3- 1m tùy theo giống. Thân cây lúc non có màu xanh hoặc tím,

khi về già chuyển màu nâu nhạt. Màu sắc của thân cây có thể cho biết màu của hoa, thân màu xanh sẽ ra hoa màu trắng, thân màu tím sẽ ra hoa màu tím đỏ. Rễ đậu tương là loại rễ cọc gồm rễ cái và các rễ bên, trên có nhiều nốt sần chứa vi khuẩn *Rhizobium japonicum* có khả năng cố định đạm từ N_2 không khí. Nốt sần có thể dài 1cm, đường kính 5- 6mm, khi mới hình thành có màu trắng sữa, khi phát triển tốt nhất nốt sần có màu hồng. Nốt sần tập trung nhiều ở tầng đất có độ sâu từ 0- 20cm, cố định N_2 không khí thành đạm với lượng đạm khoảng 30 - 60 kg/ha. Cây đậu tương có ba loại lá: lá mầm, lá đơn, lá kép. Mỗi lá kép thường có 3 thùy (lá chét), lá kép mọc so le, trên phiến lá có nhiều lông tơ. Hình dạng của lá thay đổi theo giống, những giống có lá dài và nhỏ thường chịu hạn tốt nhưng cho năng suất thấp, những giống lá to cho năng suất cao hơn nhưng cũng chịu hạn kém hơn [4].

Hoa đậu tương được phát sinh từ nách lá, đầu cành hoặc đầu thân. Hoa mọc thành chùm, mỗi chùm thường có từ 3- 5 hoa. Hoa lưỡng tính nên tỷ lệ giao phấn rất thấp, ~0,5- 1%. Quả đậu tương dạng thẳng hoặc hơi cong, dài 2- 7cm. Mỗi quả thường có 2- 3 hạt. Hạt đậu tương có hình dạng và màu sắc của rốn hạt đặc trưng cho mỗi giống. Hạt có thể là hình tròn hoặc bầu dục với khối lượng 1000 hạt dao động từ 100- 200g. Những giống có hạt màu vàng có giá trị thương phẩm cao [4].

Thời kỳ cây ra hoa chịu ảnh hưởng cộng gộp của điều kiện ánh sáng và nhiệt độ. Cây ra hoa sớm hay muộn, thời gian dài hay ngắn sẽ phụ thuộc vào từng giống và thời vụ gieo trồng. Đậu tương là cây trồng ngắn ngày, thích hợp với nhiều loại đất và nhiều vụ trong năm nên có thể trồng xen canh, gối vụ rất thuận lợi cho phát triển sản xuất nông nghiệp để khai thác lợi thế của vùng khí hậu nhiệt đới. Trong suốt thời gian sinh trưởng, nhu cầu nước của cây không đồng đều qua các giai đoạn khác nhau. Yêu cầu về độ ẩm đồng ruộng trung bình là 50- 60%; trong đó giai đoạn ra hoa, hình thành quả độ ẩm phải đạt 70- 80% nên đậu tương được xếp vào nhóm cây trồng có nhu cầu cao về nước. Dựa vào thời gian sinh trưởng, đậu tương được chia thành nhiều loại. Loại chín rất sớm thu hoạch sau 80-90 ngày; chín sớm thu hoạch sau 90- 100 ngày; chín trung bình thu hoạch sau 100 - 110 ngày; chín muộn

trung bình thu hoạch sau 110- 120 ngày; chín muộn thu hoạch sau 130 - 140 ngày và chín rất muộn thu hoạch sau 140- 150 ngày [4].

1.3.2. Chuyển gen ở đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Đậu tương chuyển gen là một trong những cây trồng biến đổi gen được trồng đại trà sớm nhất, với diện tích trồng nhiều nhất trên thế giới. Thông thường, để chọn lọc được các giống cây trồng biến đổi gen mới có giá trị ứng dụng, các nhà nghiên cứu cần phải được chọn lọc từ hàng trăm, hàng nghìn, thậm chí hàng chục nghìn sự kiện biến đổi khác nhau. Bộ gen đậu tương tuy đã được giải trình tự nhưng hầu hết chức năng của các gen vẫn còn chưa được biết rõ. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra một phương pháp chuyển gen hiệu quả và ổn định sẽ là tiền đề quan trọng để tìm hiểu chức năng của gen ở cây đậu tương và phát triển các giống đậu tương mới bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Hiện nay, kỹ thuật chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* được sử dụng rộng rãi. *A. tumefaciens* là một loại vi khuẩn gram âm, phổ biến trong đất và gây bệnh khối u ở thực vật. *A. tumefaciens* có khả năng lây nhiễm một cách tự nhiên giữa các loài thực vật. *A. tumefaciens* có thể lây nhiễm cho cây thông qua Ti plasmid, một phân tử DNA vòng tương đối lớn, kích thước khoảng 150-200kb. Tuy nhiên chỉ có một đoạn DNA nhỏ (T-DNA, 2- 3 kb) nằm trên Ti plasmid có khả năng thâm nhập vào hệ gen của tế bào chủ và được di truyền cho thế hệ sau. Các gen tạo khối u trên T- DNA khi xâm nhập hệ gen tế bào chủ tham gia vào quá trình sinh tổng hợp auxin và cytokinin, gây nên sự phân chia tế bào liên tục tạo ra các khối u trên cơ thể thực vật [8].

Xuất phát từ nguyên lý xâm nhập của Ti- plasmid và hoạt động của T- DNA, các nhà khoa học đã cải biến Ti- plasmid làm vector chuyển gen ở thực vật. Ti- plasmid được cắt bỏ các đoạn gen gây phát triển khối u, thay thế bằng các gen quan tâm có gắn thêm gen chỉ thị chọn lọc, để lại đoạn gen *vir* và T-DNA tối thiểu mang điểm có thể ghép gen ngoại lai.

Hiện nay, nhờ cải tiến và hoàn thiện của kĩ thuật chuyển gen, hiệu suất chuyển gen được nâng cao và rút ngắn thời gian chọn tạo giống cây trồng, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của sản xuất nông nghiệp. Sự biến nạp bằng vi khuẩn *Agrobacterium* là lựa chọn tốt nhất để chuyển đổi thực vật do hoạt động đơn giản, khả năng tái tạo cao, số lượng bản sao thấp và chi phí thí nghiệm thấp. Phương pháp này cũng có thể chuyển một đoạn lớn gen ngoại lai vào hệ gen của cây chủ. Khoảng 85% cây chuyển gen thu được bằng phương pháp biến nạp qua *Agrobacterium* [173].

Ở đậu tương, phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* là một phương pháp được ưu tiên. Kể từ khi Hinchee và cs (1988) sử dụng các nách lá mầm đậu tương làm mẫu cấy để thu được cây đậu tương chuyển gen đầu tiên bằng phương pháp biến nạp qua vi khuẩn *Agrobacterium* [74]. Đến nay, nhiều quy trình chuyển gen đã được áp dụng đối với cây đậu tương, nhưng phổ biến vẫn là biến nạp gen bằng lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn một số hạn chế cần được khắc phục như thao tác tạo tổn thương cần có độ chính xác cao, nồng độ vi khuẩn sử dụng cho biến nạp cần tối ưu theo từng chủng, nồng độ chất chọn lọc sử dụng cho chọn lọc cây chuyển gen... Ngoài ra, hiệu quả chuyển gen còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống đậu tương. Paz và cs (2006), đã cải tiến phương pháp chuyển gen bằng cách ngâm hạt trong môi trường 24 giờ và lấy “nửa hạt” làm mẫu cấy, kết quả biến nạp đạt hiệu suất 3,8% cao hơn 1,5 lần so với sử dụng các nách lá mầm từ cây con 5- 7 ngày tuổi, nhưng vẫn còn thấp so với hiệu quả chuyển đổi ở các cây trồng khác [122]. Li và cs (2017), nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* ở đậu tương bằng cách cải thiện hiệu quả lây nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium* và hiệu quả tái sinh của mẫu cấy. Kết quả cho thấy, hiệu quả lây nhiễm đạt trên 96% khi nồng độ vi khuẩn *Agrobacterium* ở OD 650 = 0,6; nồng độ dithiothreitol là 154,2 mg/l và đồng nuôi cấy trong 5 ngày. Nghiên cứu này cung cấp một quy trình cải tiến cho quá trình biến nạp qua vi khuẩn *Agrobacterium* ở đậu tương và là tài liệu tham khảo hữu ích để cải thiện hiệu quả chuyển nạp ở các

loài thực vật khác [95].

Quy trình chung để chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở đậu tương gồm các bước sau: tạo nguyên liệu biến nạp gen và chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm; lây nhiễm và đồng nuôi cấy trong tối trên môi trường đồng nuôi cấy; các mẫu biến nạp được nuôi cấy trên môi trường tạo đa chồi có bổ sung kháng sinh; các lá mầm sống sót được loại bỏ khỏi chồi và nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi có bổ sung kháng sinh; khi các chồi phát triển đạt kích thước nhất định được chuyển sang môi trường tạo rễ có bổ sung kháng sinh; cuối cùng cây hoàn chỉnh, khỏe mạnh được chuyển ra bầu để theo dõi phân tích [8]. Trong quá trình này, nhiều yếu tố như loại mẫu cấy, nồng độ vi khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy và thành phần môi trường sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả biến nạp. Hiệu quả tái sinh và biến nạp cũng khác nhau giữa các giống đậu tương khác nhau [168]. Chính vì vậy, việc tối ưu quy trình chuyển gen cho phù hợp với kiểu gen của từng giống đậu tương được nhiều nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm.

1.3.3. Nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen

1.3.3.1. Chuyển gen nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương trên thế giới

Khả năng chịu hạn là một đặc điểm số lượng, khó nghiên cứu do nhiều gen đóng góp. Một trong những phương pháp để cải thiện khả năng chịu hạn của cây trồng có nhiều tiềm năng là sử dụng các gen chuyển- một gen “ngoại lai” được chuyển từ loài thực vật này sang loài thực vật khác [87]. Một gen chuyển có tên *AtMYB44* từ cây *Arabidopsis* mã hóa yếu tố phiên mã gây ra sự đóng khí khổng bằng cách điều hòa tích cực tín hiệu ABA được chuyển vào đậu tương giúp tăng khả năng chịu hạn ở thực vật [142]. Gen *P5CR* từ cây *Arabidopsis* được sử dụng để chuyển vào cây đậu tương cũng có thể làm tăng khả năng chịu hạn của cây đậu tương chuyển gen. Gen *P5CR* mã hóa L- Δ^1 -pyrroline-5- carboxylate reductase, xúc tác cho bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp proline (NCBI, AT5G14800). Gen *P5CR* cũng có thể tăng cường quá trình thoái hóa proline, do đó giúp duy trì NADP^+ và cho phép thực vật thích nghi với áp lực môi trường [45].

Gen *Hahb-4* từ hoa hướng dương (*Helianthus annuus*), mã hóa một yếu tố phiên mã có thể liên kết vùng điều hòa phiên mã mất nước của các gen liên quan đến phản ứng chống chịu hạn của cây trồng (ISAAA, 2019). Công ty Verdeca LLC đã tạo ra cây đậu tương chứa gen *Hahb-4*, để tạo ra “đặc điểm HB4”. Điều này đã được thực hiện bằng cách chèn gen *Hahb-4* vào cây đậu tương bằng phương pháp biến nạp qua trung gian *A. tumefaciens*. Hiện nay, đặc điểm HB4 là đặc điểm biến đổi gen duy nhất được chấp thuận để tăng khả năng chịu hạn ở đậu tương [17].

Năm 2009, Valente và cs đã nghiên cứu chuyển gen *BiP* mã hoá chất môi giới phân tử giúp tăng khả năng chịu hạn ở đậu tương và làm chậm quá trình lão hóa của lá do khô hạn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng chuyển gen *BiP* có lượng protein và *mRNABiPD* đậu tương cao hơn so với cây đối chứng, khả năng dẫn truyền và thoát hơi nước của khí khổng lớn hơn. Những kết quả này chứng minh rằng sự tăng cường biểu hiện gen *BiP* trong đậu tương cho phép chống chịu với stress hạn [156].

Gen *GmFDL19* mã hoá cho một trong những yếu tố thuộc họ phiên mã bZIP (basic leucine zipper), là chất thúc đẩy ra hoa và đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng, phát triển ở đậu tương. Cây đậu tương chuyển gen *GmFDL19* có khả năng cải thiện khả năng chống chịu stress phi sinh học. Biểu hiện của gen *GmFDL19* đậu tương giúp tăng cường khả năng chịu hạn và mặn ở giai đoạn cây con. Chiều cao tương đối của cây và khối lượng khô tương đối của chồi ở cây chuyển gen cao hơn đáng kể so với cây WT sau khi xử lý PEG và muối. Ngoài ra, tỷ lệ nảy mầm và chiều cao cây của cây đậu tương chuyển gen cũng cao hơn đáng kể so với cây WT sau khi xử lý muối khác nhau. Hơn nữa, *GmFDL19* có thể làm giảm sự tích tụ hàm lượng ion Na^+ và điều chỉnh sự biểu hiện của một số gen ABA/ đáp ứng với stress ở đậu tương chuyển gen [96].

Các yếu tố thuộc họ phiên mã WRKY có liên quan đến sự phát triển của thực vật và điều chỉnh các phản ứng với stress phi sinh học như hạn, mặn và tín hiệu ABA. Trong đó, protein GsWRKY20 có vai trò quan trọng trong việc tăng cường

khả năng chịu hạn và điều chỉnh tín hiệu ABA ở cây đậu tương. Ning và cs (2017), đã chuyển gen *GsWRKY20* vào cây đậu tương dưới sự điều khiển của promoter 35S. Kết quả cho thấy, khả năng chống chịu hạn ở cây chuyển gen *GsWRKY20* được cải thiện đáng kể so với cây không chuyển gen. Trong điều kiện stress hạn, cây chuyển gen có mức độ tổn thương màng ít hơn, hoạt động của enzyme chống oxy hóa cao hơn và hàm lượng proline tự do nhiều hơn giúp cây chống chịu với hạn hán. Cây đậu tương chuyển gen *GsWRKY20* có mật độ khí khổng thấp hơn, khí khổng đóng nhanh hơn làm giảm sự mất nước trong điều kiện khô hạn. Ngoài ra, cây đậu tương *GsWRKY20* còn có chiều cao cây cao hơn, rễ dài hơn và năng suất hạt cao hơn ở giai đoạn phát triển trong điều kiện stress hạn [113]. Stress hạn cũng làm tăng sản xuất các loại ROS và tổn thương tế bào. Để giảm sự tích tụ ROS quá mức trong đậu tương, gen *AtYUCCA6* đã được biến nạp vào đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*, kết quả biểu hiện gen *AtYUCCA6* trong cây đậu tương làm giảm sản lượng ROS và tăng khả năng chịu hạn [120].

Năng suất cây trồng bị thách thức bởi các áp lực phi sinh học, trong đó stress hạn là phổ biến nhất. Các gen *NF-Y*, đặc biệt là các gen *NF-YA*, quy định khả năng chống chịu với stress phi sinh học. NF-Y là protein cảm ứng nhiệt gồm ba tiểu đơn vị NF-YA, NF-YB và NF-YC chịu trách nhiệm điều khiển hoạt động của một nhóm gen điều hoà chu kỳ phân bào. Sự biểu hiện của protein NF-YA góp phần điều chỉnh hoạt động của NF-Y. Cây đậu tương chuyển gen và cây *Arabidopsis* chuyển gen *GmNFYA5* thể hiện khả năng chịu hạn đáng kể xác định bởi các chỉ số sinh lý và mức độ phiên mã của các gen liên quan đến stress hạn. *GmNFYA5* là một gen tích cực có thể tăng khả năng chống chịu hạn và có tiềm năng sử dụng trong tạo giống đậu tương chuyển gen [101].

1.3.3.2 Chuyển gen nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương ở Việt Nam

Nghiên cứu chuyển gen liên quan đến khả năng chịu hạn, chịu nóng của cây đậu tương ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu được công bố. Năm 2010, Chu Hoàng Mậu và cs đã 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. Tác giả 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/P5CS* 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 [103].

Gen *EXP1* mã hóa expansin có khả năng nói lỏng thành tế bào thực vật. Ở đậu tương gen *GmEXP1* được kích hoạt đặc biệt trong quá trình kéo dài rễ, đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của rễ. Trong thời kỳ khô hạn, sự thay đổi áp suất trong tế bào và sự phát triển nhanh của rễ cho phép cây hút nước từ tầng đất sâu, từ đó giúp cây sinh trưởng và phát triển. Lo và cs (2015) đã nhân bản thành công và tạo ra cấu trúc *GmEXP1* biểu hiện protein expansin tái tổ hợp trong cây thuốc lá. *GmEXP1* được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen và truyền cho thế hệ sau. Cây thuốc lá chuyển gen đã cải thiện khả năng chịu hạn, thể hiện ở cả chiều dài và khối lượng rễ [100].

Lê Thị Hồng Trang và cs (2019) đã chuyển gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* (*GmCHI1A*) có nguồn gốc từ cây đậu tương vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và tạo được cây thuốc lá chuyển gen. Từ 90 mẫu biến nạp đã tạo được 30 cây thuốc lá chuyển gen sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới, hiệu suất chuyển gen đạt 33,33%. Kết quả phân tích PCR thu được 22 cây thuốc lá chuyển gen có gen chuyển *GmCHI1A* và hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn này là 24,44%. Gen chuyển *GmCHI1A* được xác nhận đã biểu hiện ở cây thuốc lá bằng phân tích RT-PCR. Kết quả chuyển gen *GmCHI1A* vào cây thuốc lá là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen [10].

Đặc tính chịu hạn ở cây đậu tương là tính trạng đa gen, sản phẩm của các gen này liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện của đặc tính chịu hạn hoặc có chức năng điều hòa nhóm gen chịu hạn. Nhân tố phiên mã (DREB) là một phân họ

protein thực vật được biểu hiện khi cây đậu tương gặp stress phi sinh học. Các protein DREB kích hoạt quá trình phiên mã của các gen chịu hạn. Tan và cs (2015), đã nghiên cứu thiết kế vector mang cấu trúc chứa gen *GmDREB2* từ giống DT2008 chịu hạn. Vector tái tổ hợp 35S- *GmDREB2*- *c-myc* được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen. Trong điều kiện khô hạn, sự tích lũy proline của các dòng thuốc lá chuyển gen cao hơn so với cây WT. Những kết quả này đã cung cấp cơ sở để tạo ra cây đậu tương chịu hạn nhờ tăng cường biểu hiện gen *GmDREB2* [153]. Năm 2020, Phạm và cs đã nghiên cứu mối quan hệ giữa sự biểu hiện gen *GmDREB2* với mức độ phiên mã của gen *GmP5CS*, sự tích lũy proline và khả năng chịu hạn của đậu tương chuyển gen cây làm cơ sở để chọn lọc các dòng chuyển gen có khả năng chịu hạn cao. Gen *GmDREB2* đã được đưa vào vector chuyển gen thực vật và cấu trúc 35S-*GmDREB2*-*cmyc* đã được chuyển vào cây đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. Protein GmDREB2 tái tổ hợp (~20 kDa) được biểu hiện trong bốn dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T₁. Gen *GmP5CS* được chứng minh là đã tăng biểu hiện đáng kể ở các dòng đậu tương chuyển gen T₂ và cao hơn so với các cây không chuyển gen khi xem xét cả trong điều kiện tưới đủ nước và điều kiện hạn luân lượt từ 1,06- 1,31 lần và 1,37- 1,95 lần. Hàm lượng proline của bốn dòng đậu tương chuyển gen tăng 155,81% lên 187,42% sau 5 ngày gây hạn và tăng từ 180,52% lên 233,74% sau 9 ngày gây hạn. Do đó, sự biểu hiện gen *GmDREB2* đã làm tăng mức độ phiên mã của gen *P5CS*, tích lũy proline và khả năng chịu hạn của cây đậu tương chuyển gen. Việc chuyển gen *GmDREB2* vào cây đậu tương được xác nhận bằng kết quả của các dòng biến đổi gen ở thế hệ T₂ có khả năng chịu hạn cao hơn so với các dòng cây không chuyển gen [123].

Nguyễn và cs (2019) đã nghiên cứu biểu hiện gen *GmDREB6* được tổng hợp nhân tạo trong cây thuốc lá trước khi chuyển vào cây đậu tương. Gen chuyển *GmDREB6* được xen cài vào trong hệ gen và biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen ở mức độ phiên mã. Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* hoạt động tốt trên cây thuốc lá, và có thể được sử dụng để chuyển gen vào cây đậu tương giúp cải

thiện khả năng chống chịu stress phi sinh học [111]. Tiếp nối thành công trên, năm 2021, Phutthakone Vacixaxa và cs đã nghiên cứu biến nạp gen *GmDREB6* thông qua *A. tumefaciens* vào giống đậu tương DT22. Trong số 450 mảnh lá mầm của giống đậu tương DT22 mang vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* được biến nạp thông qua *A. tumefaciens* có 185 mẫu tạo chồi và có 583 chồi được tạo ra. Sau chọn lọc bằng *kanamycin* trong môi trường SIM và SEM thu được 109 chồi chuyển sang môi trường ra rễ, kết quả có 53 cây được trồng trên giá thể và 12 cây sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới. Kết quả phân tích phân tử của 12 dòng cây chuyển gen ở thế hệ T₀ cho thấy, có 8 dòng dương tính với PCR, hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích đạt 1,78% [11].

Như vậy, cho đến nay, những nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong việc cải thiện khả năng chịu hạn ở cây đậu tương ở nước ta mới chỉ được thực hiện theo hướng chính là chuyển các gen chức năng liên quan trực tiếp đến tính chịu hạn vào cây đậu tương mà chưa thấy công bố kết quả chuyển gen mã hóa enzyme liên quan đến tổng hợp các chất duy trì áp suất thẩm thấu tăng cường khả năng chịu hạn ở cây đậu tương. Chính vì vậy, việc chọn tạo các giống đậu tương chuyển gen *codA* mã hóa choline oxydase tham gia vào quá trình sinh tổng hợp GB ở Việt Nam là hướng đi mới, có tính thời sự và cấp thiết.

1.3.4. Tình hình nghiên cứu chuyển gen *codA* ở thực vật

CodA là gen mã hóa *choline oxidase*, enzyme chìa khóa trong quá trình tổng hợp và tích lũy GB, duy trì áp suất thẩm thấu trong tế bào. Gen *codA* đã được chuyển vào một số loài cây trồng và chúng được tăng cường được khả năng chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi. Việc chuyển gen *codA* của vi khuẩn *Arthrobacter globiformis* vào cây trồng có thể giúp cây chuyển gen chống chịu được các điều kiện bất lợi từ môi trường. Một số loài cây trồng chuyển gen *codA* mã hóa choline oxydase sinh tổng hợp GB tăng khả năng chống chịu với stress phi sinh học được thống kê trong bảng 1.1. Cho đến nay, không có báo cáo nào về cây chuyển gen tích lũy GB thể hiện các đặc điểm không mong muốn khi được trồng

trong điều kiện bình thường. Các cây chuyển gen tích lũy GB thực sự tốt hơn cây WT về các thành phần năng suất. Do đó, kỹ thuật chuyển gen tích lũy GB không chỉ tăng cường khả năng chống chịu với stress phi sinh học mà còn có thể tăng tiềm năng năng suất khi cây được trồng trong điều kiện bình thường, mang lại cơ hội cho ngành công nghệ sinh học nông nghiệp. Nhiều công trình nghiên cứu chuyển gen *codA* nhằm tăng khả năng chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi vào các cây trồng khác nhau đã được công bố trong những năm gần đây.

Năm 2011, Goel và cs đã chuyển gen *codA* vào cây cà chua cho thấy khả năng chịu mặn của cả cây và lá trong giai đoạn hạt nảy mầm và cây con. Lá của các cây chuyển gen *codA* có hàm lượng nước, diệp lục và GB đều cao hơn so với cây đối chứng khi chịu tác động của muối và nước. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện của gen *codA* ở cây cà chua chuyển gen đã gây ra sự tổng hợp GB và cải thiện khả năng chống chịu của cây đối với các stress mặn và hạn [65].

Cheng và cs (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của gen *codA* đối với khả năng chịu hạn và phục hồi ở một giống khoai tây chuyển gen *codA* và một giống đối chứng không chuyển gen trong điều kiện hạn hán vừa và hạn nặng. Kết quả xử lý hạn bằng phương pháp PEG 20% cho thấy sự biểu hiện của gen *codA* trong cây khoai tây chuyển gen và sự tích lũy GB ; thể nước của lá cao hơn so với cây không chuyển gen. Trong giai đoạn phục hồi sau stress hạn, cây chuyển gen *codA* cho thấy khả năng chống oxy hoá mạnh hơn, hệ thống quang hợp hiệu quả hơn, hàm lượng chất diệp lục cao hơn, hàm lượng malondialdehyde thấp hơn và phục hồi tốt hơn so với cây đối chứng [38].

Năm 2014, Li và cs đã nghiên cứu biểu hiện gen *codA* dưới sự kiểm soát của promoter *SWPA2* vào lục lạp của cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa* L. cv. Xinjiang Daye) và tiến hành đánh giá cây chuyển gen trong các điều kiện stress phi sinh học khác nhau. Các cây chuyển gen *codA* cho thấy khả năng chống chịu tăng cường đối với NaCl và stress hạn trên toàn bộ cây. Khi cây được xử lý 250 mM NaCl trong 2 tuần, cây chuyển gen *codA* duy trì hàm lượng diệp lục cao hơn và mức

malondialdehyde thấp hơn so với cây không chuyển gen. Trong điều kiện stress hạn, tất cả các cây chuyển gen đều cho thấy khả năng chống chịu với stress hạn được nâng cao hơn thông qua việc duy trì được hàm lượng nước tương đối cao và tăng hàm lượng GB và proline so với cây không chuyển gen [94].

Kết quả chuyển gen *codA* mã hoá *choline oxidase* vào lục lạp của cây khoai lang dưới sự điều khiển của promoter *SWPA2* của Park và cs (2015) cho thấy, khả năng chống chịu đối với stress oxy hóa methyl viologen và stress hạn. Khi xử lý methyl viologen ở nồng độ 5 μM , tất cả các cây khoai lang chuyển gen *codA* đều có tăng khả năng chống chịu với stress oxy hóa thông qua việc duy trì ion thấp và tăng mức GB so với cây đối chứng. Khi cây trồng trong điều kiện khô hạn, cây chuyển gen *codA* đã cho thấy khả năng chống chịu và duy trì hàm lượng nước cao hơn so với cây đối chứng [121].

Cây dương (*Populus alba* $\times$ *Populus glandulosa*) là loài cây có giá trị kinh tế và chức năng sinh thái quan trọng. Việc nghiên cứu cơ chế phản ứng của cây dương chuyển gen biểu hiện gen *codA* đối với stress hạn có thể cung cấp cơ sở lý thuyết cho việc nhân giống và ứng dụng cây dương chịu hạn. Theo nghiên cứu của Ke và cs (2016), cây dương chuyển gen *codA* dưới sự điều khiển của promoter *SWPA2* có khả năng tăng trưởng tốt hơn, tích lũy lượng GB cao hơn trong điều kiện stress oxy hóa so với cây không chuyển gen. Ngoài ra, các cây chuyển gen còn tăng cường khả năng chống chịu với hạn hán và stress mặn do tăng hiệu quả hoạt động của hệ thống quang hoá PSII [86]. Cũng nghiên cứu trên đối tượng cây dương chuyển gen *codA*, Sun và cs (2017) đã đánh giá ảnh hưởng của stress hạn lên sự phát triển của cây, hàm lượng hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), GB và các hoạt động của enzyme chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, trong điều kiện khô hạn, cây dương chuyển gen sinh trưởng tốt và có khối lượng khô của chồi và rễ cao; hàm lượng H_2O_2 và MDA trong lá tăng lên rõ rệt nhưng giảm liên tục sau khi được bù nước; hàm lượng proline và GB tự do trong lá của cây dương chuyển gen cao hơn 2,38 lần so với ở cây không chuyển gen. Hoạt động của các enzyme SOD,

POD, CAT và APX trong lá tăng dần khi thời gian khô hạn kéo dài và sau đó giảm sau khi bù nước; ngoại trừ POD, ba hoạt tính enzyme chống oxy hóa khác trong dòng chuyển gen cao hơn đáng kể so với hoạt động của các cây đối chứng. Như vậy, việc tăng hàm lượng chất điều chỉnh thẩm thấu và tăng cường hoạt động của enzyme chống oxy hóa có thể là cơ chế sinh lý nội tại của việc tăng cường khả năng chống hạn và khả năng phục hồi của cây dương chuyển gen *codA* [152].

Để tăng khả năng chống chịu stress phi sinh học, Baloda và cs (2017) đã nghiên cứu chuyển gen *codA* vào cây đậu xanh. Kỹ thuật PCR, dot-blot, ELISA và Western blot được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện ổn định của gen chuyển *codA* trong cây chuyển gen. Tiến hành kiểm tra độ nhạy cảm của cây chuyển gen với stress mặn thông qua sự héo của các mảnh lá kích thước 1cm được đặt trên dung dịch NaCl (50-200 mM) trong 4 ngày cho thấy, các mảnh lá đậu xanh từ cây không chuyển gen bị héo hoàn toàn trong khi mảnh lá từ cây chuyển gen vẫn còn xanh và tươi. Nghiên cứu đã cho thấy vai trò của con đường sinh tổng hợp GB được thực hiện bởi gen *codA* mã hoá enzyme choline oxidase để tăng cường khả năng chống chịu stress ở cây đậu xanh [21].

Kỹ thuật di truyền plastid là một phương pháp hiệu quả để tạo cây khoai tây chịu hạn tích lũy GB trong lục lạp. Gen *codA* từ *A. globiformis* đã được chuyển thành công vào bộ gen lục lạp của khoai tây bằng kỹ thuật di truyền plastid. Qua phân tích Southern blot, mức mRNA của *codA* trong cây khoai tây chuyển gen ở lá cao hơn nhiều so với ở củ. Hàm lượng GB được tích lũy ở mức độ cao ở trong cả lá và củ của cây khoai tây chuyển gen. Việc tăng hàm lượng GB ở cây chuyển gen mang lại khả năng chống chịu đáng kể trong điều kiện stress hạn. Hơn nữa, hàm lượng nước, hàm lượng chất diệp lục, hiệu suất quang hợp, hoạt động của enzyme chống oxy hóa khi xử lý stress hạn tăng đáng kể trong lá của cây chuyển gen. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, sinh tổng hợp GB bằng kỹ thuật di truyền plastid là một phương pháp hiệu quả để tăng khả năng chịu hạn ở thực vật [171].

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) và choline oxidase (COD) là những

enzyme quan trọng trong quá trình tổng hợp GB. Trong nghiên cứu của Zhang và cs (2020), hai loại cây cà chua chuyển gen *BADH* và gen *codA* được sử dụng để đánh giá khả năng chịu stress nhiệt. Kết quả cho thấy, hàm lượng GB trong lá của mười bốn dòng chuyển gen dao động từ 1,9- 3,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ khối lượng tươi, trong khi GB hầu như không thể phát hiện được trong lá của cây WT. Quá trình đồng hóa CO_2 và hoạt động của hệ thống quang hoá II ở cây chuyển gen có khả năng chịu nhiệt tốt hơn so với cây WT, đặc biệt là ở cây chuyển gen *codA*. Cây WT có sự tích lũy hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide (O_2^-) và malondialdehyde (MDA) nhiều hơn cây chuyển gen; trong đó, cây chuyển gen *codA* tích lũy ít nhất. Hơn nữa, sự biểu hiện của các protein sốc nhiệt HSP70 được tìm thấy ở cây chuyển gen nhiều hơn so với cây WT khi bị stress nhiệt, đặc biệt là ở cây chuyển gen *codA*. Kết quả nghiên cứu này chỉ rõ vai trò tích cực của GB trong phản ứng với stress nhiệt, giúp tăng cường khả năng chịu nhiệt ở thực vật chuyển gen. Cây cà chua chuyển gen *codA* có khả năng chịu nhiệt cao hơn cây cà chua chuyển gen *BADH* và H_2O_2 , một sản phẩm phụ từ sự biểu hiện của gen chuyển *codA*, đóng một vai trò quan trọng như một phân tử tín hiệu trong khả năng chịu nhiệt của cây chuyển gen [175].

Ngoài ra, ở một số cây chuyển gen *codA*, người ta quan sát thấy lượng GB tích lũy không những mang lại khả năng chống chịu stress mà còn cải thiện khả năng sinh sản và tăng năng suất [118]. Cây cà chua chuyển gen tích lũy GB trong cơ quan sinh sản cao gấp 2,8- 3,8 lần so với trong lá. Hàm lượng GB tăng lên đã nâng cao khả năng chịu lạnh đồng thời tăng khả năng đậu trái từ 10-30% trong điều kiện stress lạnh [116]. Biểu hiện của gen *codA* dẫn đến cải thiện sự phát triển của hoa và quả. Cây chuyển gen tạo ra hoa to hơn và quả nặng hơn 54% so với đối chứng không chuyển gen. Những kết quả này chỉ ra rằng, việc sử dụng các gen sinh tổng hợp GB không có tác dụng phụ mà còn rất có lợi khi có tác động tích cực đến các cơ quan sinh sản cả trong điều kiện bình thường và stress.

Zang và cs (2019) nhận thấy, việc chuyển gen *codA* và *BADH* ở cây cà chua gây ra sự hình thành hoa và quả to hơn. Ngoài ra, cây cà chua chuyển gen có tốc độ

quang hợp cao hơn, hàm lượng các chất đồng hóa và hàm lượng diệp lục trong lá cao hơn cây không chuyển gen. Việc gia tăng kích thước quả có liên quan đến hàm lượng phytohormone, chẳng hạn như auxin, brassinolide, gibberellin và cytokinin được điều chỉnh bởi GB. Kết quả qPCR chỉ ra rằng mức độ biểu hiện của một số gen liên quan đến sự tăng trưởng và phát triển của quả cũng được nâng cao ở cây chuyển gen. Kết quả phân tích mức độ biểu hiện gen ở cây cà chua chuyển gen nhận thấy GB đã thúc đẩy phát triển hoa, quả cà chua thông qua nhiều con đường: quang hợp, tái bản DNA, truyền tín hiệu phytohormone và các quá trình sinh tổng hợp. Như vậy, kỹ thuật chuyển gen sinh tổng hợp GB có thể cung cấp một cách tiếp cận mới để nâng cao năng suất của cà chua và các cây trồng khác [176].

Ở Việt Nam, Bùi Văn Thắng và cs (2013) đã nghiên cứu chuyển gen *codA* tổng hợp nhân tạo mã hóa cho choline oxidase tham gia vào sinh tổng hợp GB đã được chuyển thành công vào cây Xoan ta thông qua *A. tumefaciens*. Cây xoan ta chuyển gen *codA* thu được đã tăng cường khả năng chịu hạn và chịu mặn. Hàm lượng GB tích lũy trong lá của các dòng xoan ta chuyển gen từ 2,1- 4,5 mM/g lá tươi cao hơn nhiều so với dòng xoan ta đối chứng không chuyển gen (0,7 mM/g lá tươi). Các dòng xoan ta chuyển gen đã cải thiện được khả năng chống chịu với điều kiện khô hạn [9]. Các dòng xoan ta chuyển gen *codA* thế hệ T₀ tiếp tục được đánh giá ở điều kiện môi trường nhiễm mặn nhân tạo. Kết quả cho thấy, các dòng xoan ta chuyển gen tăng cường khả năng chịu mặn so với dòng không chuyển gen. Hàm lượng GB trong lá của các dòng xoan ta chuyển gen cao hơn so với dòng WT, dòng chuyển gen TX4 (3,94 - 4,50 mM/g lá tươi), TX12 (2,38 - 2,63 mM/g lá tươi), TX27 (3,29 - 3,80 mM/g lá tươi), TX28 (3,25 - 4,27 mM/g lá tươi), TX54 (1,60 - 2,54 mM/g lá tươi) trong khi đó dòng WT hàm lượng GB trong lá tích lũy được chỉ từ 0,24- 0,81 mM/g lá tươi. Như vậy, các dòng Xoan ta chuyển gen *codA* tăng cường sinh tổng hợp GB đã cải thiện được khả năng chống chịu với điều kiện môi trường bị nhiễm mặn [5].

Bảng 1.1. Một số loài cây trồng chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase sinh tổng hợp GB tăng khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học

Đối tượng	Hàm lượng GB tích lũy, cơ quan	Bào quan mục tiêu	Khả năng chống chịu bất lợi	Tác giả, năm công bố
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,0 $\mu\text{mol/g}$ lá/hạt tươi	Lục lạp	Nhiệt độ thấp, mặn	Hayashi và cs, 1997 [72]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	12,0-18,0 $\mu\text{mol/g}$ hạt khô	Lục lạp	Nhiệt độ cao	Alia và cs, 1998 [15]
Lúa	5,3 $\mu\text{mol/g}$ lá tươi	Lục lạp/tế bào chất	Nhiệt độ thấp, mặn	Sakamoto và cs, 1998 [132]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chưa xác định chồi	Lục lạp	Ánh sáng mạnh	Alia và cs, 1999 [16]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,7-0,9 $\mu\text{mol/g}$ chồi khô	Lục lạp	Băng giá	Sakamoto và cs, 2000 [133]
Lúa	1,0-2,12 $\mu\text{mol/g}$ lá khô	Lục lạp	Mặn	Mohanty và cs, 2002 [106]
Cà chua	0,1-0,3 $\mu\text{mol/g}$ lá tươi	Lục lạp	Nhiệt độ thấp	Park và cs, 2004 [118]
Cà chua	2,0 $\mu\text{mol/g}$ cơ quan sinh sản	Lục lạp/ tế bào chất	Nhiệt độ thấp, mặn, oxy hóa	Park và cs, 2007 [117]
Cà chua	0,9-1,43 $\mu\text{mol/g}$ lá tươi	Lục lạp	oxy hóa, mặn, hạn	Ahmad và cs, 2008 [13]
Bạch đàn	0,17-0,29 mmol/g lá tươi	Chưa xác định	Mặn	Yu và cs, 2009 [172]
Cà chua	214-297 nmol/g lá tươi	Lục lạp	Mặn, hạn	Goel và cs, 2011 [65]
Khoai tây	12,0 $\mu\text{mol/g}$ lá tươi	Lục lạp	Hạn	Cheng và cs, 2013 [38]
Xoan ta	2,1- 4,5 mmol/g lá tươi	Lục lạp	Hạn	Bùi Văn Thắng và cs, 2013 [9]

Đối tượng	Hàm lượng GB tích lũy, cơ quan	Bào quan mục tiêu	Khả năng chống chịu bất lợi	Tác giả, năm công bố
Cỏ linh lăng	9,6-15,5 mmol/g lá tươi	Lục lạp	oxy hoá, hạn, mặn	Li và cs, 2014 [94]
Khoai lang	0,58- 0,60 μ mol/g lá tươi	Lục lạp	oxy hóa, hạn	Park và cs, 2015 [121]
Cây dương	1,13- 1,76 μ mol/g lá tươi	Lục lạp	oxy hóa, mặn, hạn	Ke và cs, 2016 [86]
Cây dương	Chưa xác định	Lục lạp	oxy hóa, hạn	Sun và cs, 2017 [152]
Đậu xanh	Chưa xác định (lá)	Lục lạp	Mặn	Baloda và cs, 2017 [21]
Xoan ta	3,94 - 4,50 mmol/g lá tươi	Lục lạp	Mặn	Chu Hoàng Hà và cs, 2017 [5]
Cà chua	1,0- 3,4 μ mol/g lá tươi	Lục lạp	Nhiệt độ cao	Zhang và cs, 2020 [175]

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu thực vật

Giống thuốc lá K326 sử dụng làm cây mô hình trong thí nghiệm thiết kế vector và biểu hiện gen *codA* được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu thuốc lá.

Giống đậu tương DT22 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Giống DT22 có ưu điểm vượt trội như thời gian sinh trưởng ngắn, độ thuần cao, cho năng suất cao. Tuy nhiên, giống DT22 được đánh giá là giống đậu tương thuộc nhóm có khả năng chịu hạn sinh lý, chịu mặn kém [2].

2.1.2. Các chủng vi khuẩn và các loại vector

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và *Agrobacterim tumefaciens* C58/pGV2206 (IPK, Gatersleben, Đức) được cung cấp từ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Vector *pIBTII* kích thước 11605 bp, *pCAMBIA* kích thước 13595 bp được thiết kế và sử dụng tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Trình tự gen *codA* mã hóa cho choline oxidase từ *Arthrobacter globiformis* khai thác trên Genbank (Mã số AY304485) được tối ưu hóa nhằm tăng tính biểu hiện trên thực vật, được tổng hợp và cung cấp bởi công ty Epoch Life Science Inc, Mỹ (hình 2.1).

2.1.3. Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR

Các cặp mồi PCR đặc hiệu có trình tự nucleotide và sản phẩm khuếch đại đoạn DNA có kích thước dự kiến được trình bày ở bảng 2.1. Các cặp mồi được thiết kế và tổng hợp tại Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi đặc hiệu

Tên	Trình tự 2 cặp môi (5' - 3')	Kích thước gen (bp)
<i>codA</i> -F/R	GTGTTGCAGTTGGATCGTTG CCTACACCTGGAGAGTCAA	~750
<i>Bar</i> -F/R	AAACCCACGTCATGCCAGTT GACAAGCACGGTCAACTTCC	~400
F/TP-XbaI R/cmyc-SacI	GCTCTAGAATGGCACAAATTAACA CGAGCTCTCAATTCAGATCCTCTTC	1904

ATGGCACAAATTAACAACATGGCACAAAGGGATACAAACCCTTAATCCCAATTCCAATTTCCAT
AAACCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGTTTTCTTGTTTTTGGATCTAAAAAAGTGAATAATTCA
GCAAATTCATGTTGGTTTTGAAAAAGATTCAATTTTTATGCAAAAGTTTTGTTCTTTAGGA
TTTCAGCATCAGTGGCTACAGCCTGCATGCACATCGATAATATTGAAAATCTTAGTGACAGAGA
 GTTCGACTACATTGTTGTTGGAGGTGGTTCAGCTGGAGCTGCAGTGGCTGCACGTCTTTCTGAAGAT
 CCTGCAGTTAGTGTTGCCCTGGTTGAAGCCGGACCTGATGACAGAGAGGGGTGCCAGAGGTGTTGC
 AGTTGGATCGTTGGATGGAATTGCTTGAATCTGGATACGATTGGGATTATCCAATAGAACCACAAG
 AGAATGGCAATAGTTTTATGAGGCATGCACGTGCTAAAGTCATGGGCGGTTGTTCTTCACATAACA
 GTTGCATTGCATTCTGGGCCCCAAGGGAGGATTTGGATGAGTGGGAAGCAAAATATGGTGCTACTG
 GCTGGAATGCTGAGGCGCATGGCCTCTTTACAAAAGGCTTGAACTAACGAAGATGCAGGACCAG
 ATGCTCCACATCACGGAGATTCAGGGCCTGTCCACTTGATGAATGTGCCACCTAAAGATCCAACAG
 GCGTAGCATTGTTGGATGCATGCGAACAGGCCGGCATTCTAGAGAGCCAAGTTTAATACCGGCAC
 AACAGTCGTTAATGGAGCCAACTTCTTTTCAGATTAATAGAAGGGCTGACGGGACAGGTCATCTTCA
 AGTGTCTCATATATCCATCCAATCGTCGAGCAAGAAAACCTTTACTTTGTTGACTGGTCTTAGGGCAC
 GTCAACTTGTTTTCGACGCTGATAGACGTTGCACTGGGTTGATATAGTCGACTCTGCCTTTGGACAT
 ACACATAGGCTTACAGCTAGAAACGAAGTCGTACTTTCTACTGGTGCAATTGATACACCAAAGTTG
 CTTATGTTGTCTGGAATCGGGCCTGCAGCACACCTTGCTGAACATGGAATCGAGGTGTTGGTTGAC
 TCTCCAGGTGTAGGGGAACACCTTCAAGATCACCTGAAGGAGTTGTCCAGTTCGAGGCTAAACAA
 CCAATGGTCGCCGAATCAACCCAATGGTGGGAGATCGGTATCTTTACTCCTACTGAAGACGGCCTT
 GATAGGCCAGACCTTATGATGCATTACGGTTCAGTCCCTTTTCGATATGAATACTTTGAGACATGGGT
 ATCCTACAAGTGAAGTGGATTCTCATTGACCCCTAATGTTACACATGCCAGGTCTAGGGGTACTG
 TGAGACTTAGAAGTAGGGACTTTAGAGACAAGCCTATGGTTGATCCTAGATATTTACCGACCCAG
 AAGGCCACGATATGAGAGTAATGGTGGCAGGTATTAGAAAGGCTAGAGAGATTGCAGCTCAACCT
 GCTATGGCTGAATGGACCGGTAGAGAGAGCTTTCACCAGGAGTTGAGGCCCAAACCGATGAAGAA
 TTGCAGGATTATATTCGTAAGACTCATAACACCGTTTACCACCCTGTGGGTACCGTGAGAATGGGC
 GCTGTGGAAGACGAGATGAGTCCACTTGATCCTGAATTGAGAGTGAAAGGAGTGACAGGACTTAG
 GGTCGCAGATGCTTCAGTGATGCCTGAACATGTAACAGTTAACCTAATATCACCGTGATGATGAT
 AGGTGAGCGTTGTGCTGATTTGATTAGATCAGCTAGAGAGCAGGGGAGACTACCACCGCTGATGCT
 GAACCTTCTGCAGCTTTGGCACAG**AAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTGA**

Hình 2.1. Trình tự gen *codA* được tổng hợp bởi Epoch Life Science Inc.

Màu đỏ: trình tự nucleotide mã hóa protein vận chuyển tiểu đơn vị Rubisco ở cây thuốc lá; Màu xanh đậm: trình tự nucleotide mã hoá kháng nguyên c-myc để phát hiện protein *codA* tái tổ hợp.

2.2. HOÁ CHẤT, THIẾT BỊ

2.2.1. Hoá chất

Kit tinh sạch DNA (QIAquick Gel Extraction Kit) và tách chiết plasmid (QIAprep Spin Miniprep Kit) (QIAGEN); Các loại enzyme cắt giới hạn và các hoá chất thông dụng khác (X-gal, agarose...) của các hãng Merck, Sigma, Amersham Pharmacia Biotech; *Taq polymerase*, dNTPs, thang DNA 1 kb của hãng Fermentas (Mỹ).

Các hóa chất yeast extract, bacto pepton, trypton, NaCl, agarose, sucrose, glycerol, DDT, L-Cystein, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, PPT; các chất điều hòa sinh trưởng BAP, IBA...; kháng sinh spectinomcine, rifamicine, cefotaxime... được cung cấp bởi các hãng: New England Biolabs (Anh), Amersham Pharmacia Biotech (Thụy Điển), Chemicals (Đức), Sigma (Mỹ), Duchefa (Hà Lan), Merck (Đức) và Wako (Nhật Bản).

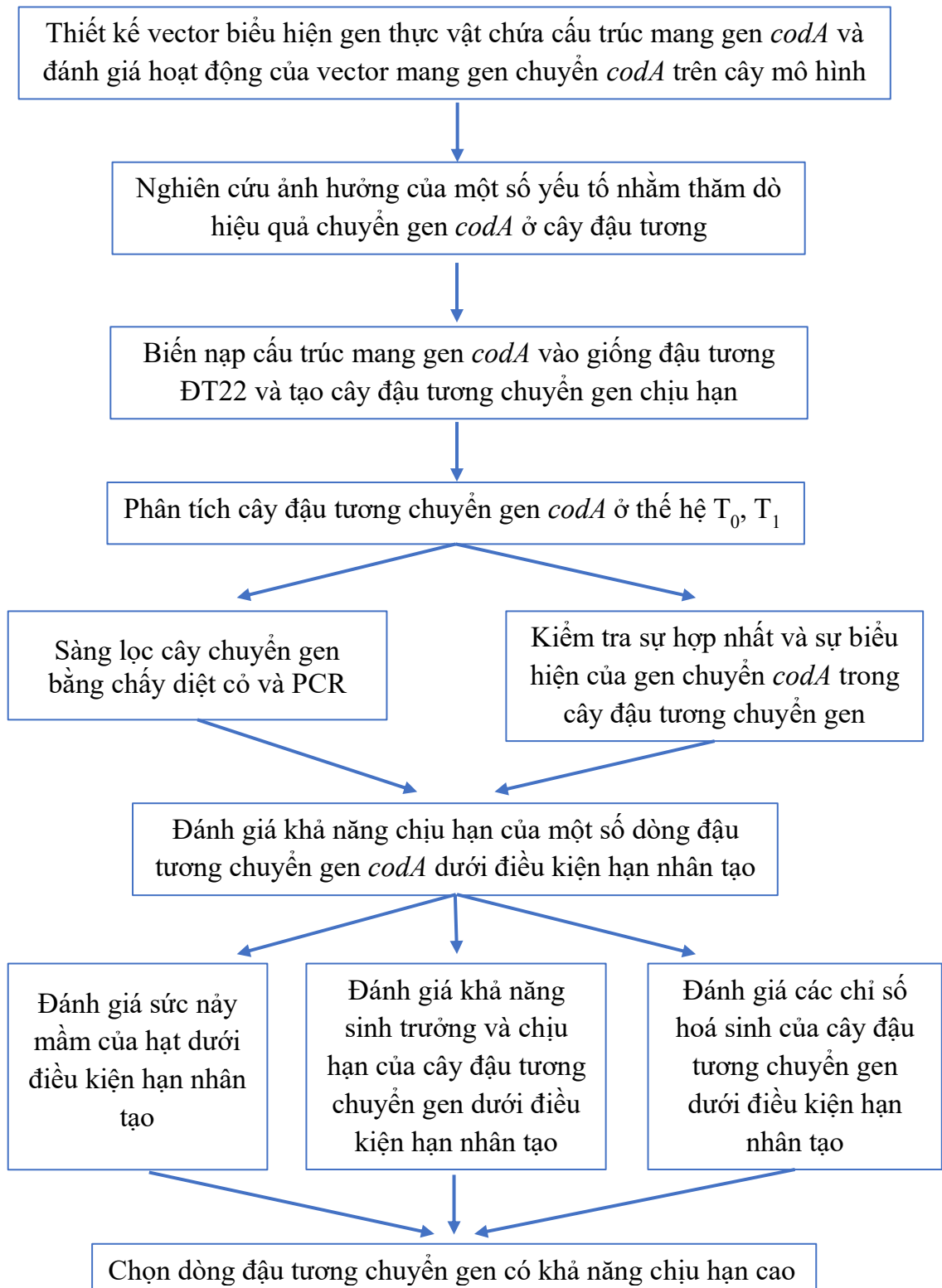
Quá trình tái sinh và chuyển gen vào cây đậu tương sử dụng các môi trường MS cơ bản (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung B5 (Gamborg, 1968); GM, SIM, SEM, RM. Môi trường nuôi khuẩn và tạo huyền phù khuẩn: YEB, CCM.

2.2.2. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật và chuyển gen gồm box cấy, bình tam giác, dàn nuôi cấy, nồi khử trùng, máy nuôi lắc, máy đo pH, máy đo OD...

Các thiết bị sử dụng trong sinh học phân tử gồm máy PCR system 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transillumination, BioRad, Mỹ), máy chụp ảnh (Amersham Pharmacia Biotech, Thụy Điển), máy Vortex (Minishaker, IKA, Đức), máy hút chân không (Savant), máy li tâm (Eppendorf), máy ổn nhiệt, máy biến nạp bằng xung điện, máy voltex... và các trang thiết bị khác của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát

2.3.1. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen *codA* và chuyển gen ở thuốc lá

2.3.1.1. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen *codA*

Phương pháp tạo cấu trúc mang gen chuyển codA

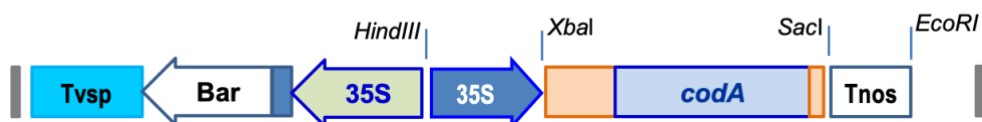
Thực hiện các phản ứng cắt enzyme giới hạn, lai tạo vector tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn theo phương pháp xung điện của Cohen và cs (1972) [40]. DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với mồi *codA-F/R*. Cắt đồng thời plasmid vector *pIBTII* và *pCAMBIA-HSP-codA*, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA* bằng cặp enzyme giới hạn *HindIII* và *EcoRI* để tạo các đầu dính tương ứng.

Plasmid *pIBTII* và *pCAMBIA-HSP-codA*, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA* sau khi tinh sạch được cắt với *HindIII* và *EcoRI*. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 0,8%. Các phân đoạn 8,8 Kb của *pIBTII* được tinh sạch và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb của *pCAMBIA-HSP-codA*, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA* được thu hồi bằng phương pháp thoi gel.

Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng *GeneJET PCR Purification Kit* của hãng Thermo Scientific như sau: Thêm vào 25 µl binding buffer, trộn đều. Cho toàn bộ dịch lên cột ly tâm. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch qua cột. Thêm vào cột 500 Wash buffer. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch qua cột. Ly tâm tiếp 13000 vòng/phút trong 1 phút. Chuyển cột ly tâm sang ống 1,5 ml. Thêm vào cột ly tâm 30 µl nước khử ion vô trùng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, thu lấy dịch.

DNA trên gel agarose được thu hồi bằng cách ủ phân đoạn gel với binding buffer tỉ lệ 1:1 để hòa tan gel. Sau đó thực hiện tương tự các bước như bên trên.

Phương pháp gắn cấu trúc mang gen chuyển codA vào vector chuyển gen pIBTII

a) *pIBTII-rd29A-codA*b) *pIBTII-HSP-codA*c) *pIBTII-35S-codA*

Hình 2.3. Sơ đồ các vector *pIBTII-rd29A-codA*, *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*

Tvsp: Terminator from soybean vegetative storage protein gene, *Tnos*: NOS terminator

Bar: gen kháng phosphinothricin, *Rd29A*: promoter cảm ứng stress hạn, *HSP*: Heat shock promoter, *35S*: promoter CaMV35S, *codA*: gen mã hóa cho choline oxidase; *HindIII*,

XbaI, *SacI*, *EcoRI*...: vị trí các điểm cắt của enzyme giới hạn

Phân đoạn của *pIBTII* và phân đoạn của *35S-codA-Nos*, *rd29A-codA-Nos*, *HSP-codA-Nos* sau khi được tinh sạch được ghép nối với nhau bằng phản ứng ligase và được biến nạp vào *E. coli* để kiểm tra vector tái tổ hợp. Thành phần phản ứng nối với T4 ligase được trình bày trong bảng 2.2. Sơ đồ cấu trúc của các vector *pIBTII-rd29A-codA*, *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA* được mô tả trong hình 2.2.

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 22°C trong 30 phút. Sau đó đặt hỗn hợp phản ứng lên đá lạnh và tiến hành biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Dịch khuẩn sau biến nạp được trải trên đĩa thạch LB chứa spectinomycin 50 mg/l. Khuẩn lạc được kiểm tra bằng phương pháp clony-PCR với mồi *codA-F/R*.

Các khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR được nuôi lỏng và tách plasmid. Kiểm tra plasmid bằng phản ứng cắt với *HindIII* và *EcoRI*.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng nối với T4 ligase

STT	Thành phần phản ứng	Thể tích(μ l)
1	Phân đoạn của plasmid <i>pIBTII</i> 25 ng/ μ l	2
2	Đoạn mang gen chuyển <i>codA</i> 10 ng/ μ l	2
3	T4 DNA ligase Buffer 10X	2
4	T4 DNA ligase (10U/ μ l)	1
5	H ₂ O deion	13
Tổng		20

Phương pháp tạo chủng A. tumefaciens C58 chứa vector chuyển gen codA

Tế bào khả biến đặt trong đá 10 -15 phút. Bổ sung 1 μ l vector chuyển gen vào ống tế bào khả biến và trộn nhẹ. Rửa cuvette bằng cồn 100°, rửa lại bằng nước khử ion, khử trùng rồi thấm khô. Chuyển tất cả hỗn hợp dịch *A. tumefaciens* C58 + vector chuyển gen vào cuvette. Xung điện: 2,5 kv, 25 μ F và điện trở 400 Ω . Đặt ngay vào đá. Sau 5- 10 phút bổ sung 300 μ l LB và trộn nhẹ. Chuyển sang ống Eppendorf 2 ml. Ủ ở 28°C trong 1 giờ trên máy lắc 200 vòng/phút. Cấy trải dịch vào đĩa chọn lọc chứa kháng sinh spectinomycine 50 mg/l và rifamicine 50 mg/l. Ủ ở 28°C trong 48 giờ.

Khuẩn lạc được sàng lọc bằng phương pháp clony-PCR. Dòng khuẩn lạc dương tính sẽ được giữ lại nuôi trong môi trường LB lỏng để sử dụng trong các thí nghiệm chuyển gen.

2.3.1.2. Chuyển các cấu trúc vector sau thiết kế vào cây thuốc lá và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

Vector tái tổ hợp được chuyển vào thuốc lá giống K326 theo phương pháp của Topping (1998) [154]. Các dòng thuốc lá chuyển gen được phân tích PCR với 2 cặp mồi *codA* F/R, *bar* F/R và được đánh giá khả năng tạo chồi và tạo rễ trong điều kiện hạn sinh lý bằng polyethylene glycol (PEG) 8000 2,5%.

2.3.1.3. Phân tích hàm lượng glycine betaine trong cây thuốc lá chuyển gen

Lá của các cây thuốc lá chuyển gen sau khi gây hạn nhân tạo được thu thập và đánh giá hàm lượng GB tích lũy theo phương pháp của Grieve và Grattan (1983) [66]. Lấy 0,5 g mẫu lá thuốc lá đã sấy khô nghiền mịn, bổ sung 20 ml nước deion, lắc 200 vòng/phút ở 25 °C trong 24 giờ. Dịch chiết được loại bỏ cặn và pha loãng với H₂SO₄ 2N theo tỷ lệ 1:1, đặt trên đá trong 1 giờ. 0,50 ml hỗn hợp được đưa vào ống chứa sẵn 0,20 ml thuốc thử KI-I₂ lạnh sau đó lắc đều. Hỗn hợp phản ứng giữ ở 4°C trong 16 giờ, sau đó ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/ phút ở 0°C trong 10 phút. Loại bỏ dung dịch, cặn thu được được cho phản ứng với 9,0 ml thuốc thử 1,2-dichloroethane. Sau 2- 2,5 giờ, tiến hành đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 365 nm bằng máy đo quang phổ. Nồng độ GB trong các mẫu thí nghiệm được xác định dựa trên đường chuẩn của dung dịch GB chuẩn. Các số liệu thu được trong nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism (V7.04 của GraphPad software Inc, Mỹ).

2.3.2. Nhóm phương pháp nghiên cứu điều kiện thích hợp cho chuyển gen ở giống đậu tương DT22

2.3.2.1. Khử trùng hạt

Hạt đậu tương DT22 to tròn đều, màu vàng sáng, vỏ hạt không bị nứt được chọn làm vật liệu chuyển gen. Hạt chín được khử trùng bằng khí Chlor (Cl₂). Khí chlore được tạo ra bằng cách bổ sung 3 ml HCl đậm đặc vào 100 ml javen thương phẩm. Việc khử trùng được thực hiện trong một bình kín và đặt trong tủ hút 14- 16 giờ. Sau khi khử trùng, hạt được gieo trên môi trường GM trong thời gian 5-7 ngày.

2.3.2.2. Chuẩn bị khuẩn

Các loại môi trường sử dụng trong quá trình nuôi cấy tạo dịch huyền phù vi khuẩn gồm: môi trường nuôi khuẩn đặc, môi trường nuôi khuẩn lỏng và môi trường tạo dịch huyền phù vi khuẩn (bảng 2.3).

Nuôi cấy tạo khuẩn lạc: cấy trái *A. tumefaciens* mang gen *codA* từ ống giữ chủng lên môi trường YEP đặc có bổ sung kháng sinh phù hợp, nuôi trong tủ ôn nhiệt 28°C trong thời gian 48 giờ.

Nuôi lỏng khuẩn: dùng que cấy chọn một khuẩn lạc riêng biệt trên đĩa khuẩn cấy vào môi trường YEP lỏng bổ sung các loại kháng sinh như nuôi đặc. Bình nuôi lỏng được lắc 200 v/p ở 28°C trong 16 giờ trong điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 2.3. Môi trường nuôi khuẩn

Yeast extract peptone (YEB) đặc	yeast extract (10 g/l) + NaCl (5 g/l) + tryptone (10 g/l) + 15g/l Bacto agar, pH = 7
Yeast extract peptone (YEP) lỏng	yeast extract (10 g/l) + NaCl (5 g/l) + tryptone (10 g/l), pH = 7

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn: Lấy 5ml dịch khuẩn thu từ quá trình nuôi lỏng bổ sung thêm vừa đủ 50ml và tiếp tục nuôi phục hồi 4- 6 giờ. Sau đó dịch khuẩn được ly tâm ở 5000 v/p trong 10 phút ở 4°C. Loại bỏ phần dịch nổi và hòa tan cặn khuẩn trong môi trường CCM lỏng có bổ sung acetosyrigone (AS) để đạt mật độ huyền phù vi khuẩn OD₆₅₀ 0,4– 1,0.

2.3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA*

Vector tái tổ hợp *pIBTII/rd29A-codA* được biến nạp vào chủng khuẩn *A. tumefaciens* C58/pGV2206 tạo *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Chủng *A. tumefaciens* mang vector *pIBTII/rd29A-codA* được lây nhiễm vào giống đậu tương ĐT22 qua nách lá mầm theo phương pháp của Olhoft và cs [115]. Xác định hàm lượng PPT sử dụng chọn lọc các chồi chuyển gen thí nghiệm từ môi trường SIM2 có bổ sung PPT với 5 mức nồng độ (0; 1; 3; 5; 7) mg/l. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ khuẩn *Agrobacterium* ở OD₆₅₀ sử dụng cho chuyển gen vào đậu tương với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ lần lượt là 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 với thời gian lây nhiễm 30 phút. Nghiên

cứu ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22 được thực hiện với các khoảng thời gian ủ lần lượt là: 15 phút; 30 phút; 45 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, 5 ngày và 8 ngày. Xác định nồng độ kháng sinh cefotaxime bổ sung vào môi trường rửa khuẩn (SIM lỏng) và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy ở các ngưỡng nồng độ là: 200 mg/l, 500 mg/l và 1000 mg/l với thời gian rửa khuẩn nghiên cứu là 5 phút, 10 phút, và 15 phút.

2.3.3. Nhóm phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen *codA*

2.3.3.1. Biến nạp di truyền và tạo cây đậu tương chuyển gen

Ba vector tái tổ hợp *pIBTII-rd29A-codA*, *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA* được biến nạp vào giống đậu tương ĐT22 bằng phương pháp biến nạp thông qua rách lá mầm theo phương pháp của Olhoft và cs (2001), có cải tiến [115]. Thành phần môi trường sử dụng trong chuyển gen *codA* ở đậu tương được trình bày trong bảng 2.4.

Các cụm đa chồi sau 2 tuần phát triển trên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM1 (không chứa PPT) tiếp tục được chọn lọc lần lượt trên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM2 (có bổ sung PPT 3 mg/l) và các môi trường kéo dài chồi SEM1, SEM2 (có bổ sung PPT 1,5 mg/l)... tương ứng với số lần cấy chuyển. Các chồi sống sót sau các lần chọn lọc được cắt tạo rễ trên môi trường RM có bổ sung IBA. Sau 7- 12 ngày, các chồi có bộ rễ hoàn chỉnh được trồng ra đất trong phòng thích nghi sinh trưởng và được kiểm tra sự có mặt của gen chọn lọc và gen đích bằng phương pháp phết chất diệt cỏ và kỹ thuật PCR.

Sàng lọc cây chuyển gen bằng chất diệt cỏ

Các dòng đậu tương chuyển gen được sàng lọc và xác định bằng thử tính kháng chất diệt cỏ theo phương pháp của Brettschneider và cs (1997) [29]. Dung dịch thuốc diệt cỏ PPT 250mg/l bổ sung 0,1 % Tween 20 được thấm trên tấm bông, phết trực tiếp lên bề mặt trên của lá của cây đậu tương cách phần ngọn lá khoảng 1,5 cm. Kết quả được ghi nhận sau 3-5 ngày tiến hành.

Bảng 2.4. Thành phần môi trường sử dụng trong chuyển gen *codA* ở đậu tương

Môi trường	Thành phần
Hạt nảy mầm (germination medium – GM)	Muối B5 3,052 g/l + sucrose 20 g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung vitamin B5 1000X 1 ml/l.
Dịch huyền phù (co-cultivation medium - CCM lỏng)	Muối B5 0,316g/l + MES 3,9g/l + sucrose 30 g/l pH = 5,4 có bổ sung acetosyringone 40 mg/l + dithiothreitol 154 mg/l + L-cysteine 400 mg/l + sodium thiosulfate 158 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + BAP 1,67 mg/l + GA ₃ 0,25 mg/l.
Đồng nuôi cấy (CCM đặc)	Muối B5 0,316 g/l + MES 3,9 g/l + Sucrose 30 g/l + 6 agar g/l, pH = 5,4 có bổ sung acetosyringone 0,04 g/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + BAP 1,67 mg/l + GA ₃ 0,25 mg/l.
Diệt khuẩn và tạo đa chồi (shoot induction medium- SIM)	Muối B5 3,052 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l, pH = 5,8, bổ sung BAP 1,67 mg/l + cefotaxime 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l.
Kéo dài chồi (shoot elongation medium- SEM)	MS 4,3 g/l + MES 0,59 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 200 ml/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxime 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + GA ₃ 0,5 mg/l + IAA 100 mg/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l.
Ra rễ (rooting medium- RM)	MS 4,3 g/l + sucrose 20 g/l + MES 0,59 g/l + gellan 2,5 g/l, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxime 250 mg/l + IBA 0,1 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l.

2.3.3.2. Phân tích cây đậu tương chuyển gen

Kỹ thuật PCR

DNA tổng số của các dòng đậu tương chuyển gen được tách chiết từ lá bằng phương pháp sử dụng CTAB của Dellaporta và cs (1983) [46]. Sau đó, xác định sự có mặt của gen *codA* và gen *bar* bằng PCR thông qua cặp mồi đặc hiệu *codA*-F/R và gen *bar*-F/R (bảng 2.1). Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 0,8%.

Kỹ thuật Southern blot

Các dòng đậu tương chuyển gen *codA* lựa chọn từ các dòng chuyển gen đã sàng lọc bằng chất diệt cỏ và kỹ thuật PCR được sử dụng để đánh giá sự có mặt và số bản copy trong hệ gen đậu tương thông qua phương pháp lai southern blot. DNA tinh sạch từ mẫu lá được cắt bằng *EcoRI*. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1%, sau đó được chuyển lên và cố định trên màng Zeta-Probe® GT (Bio-Rad, Hercules, CA, Mỹ). DNA được cố định trên màng nylon bằng tia UV. Đoạn sản phẩm PCR kích thước 500 bp được nhân bằng cặp mồi của gen *codA*, được sử dụng làm mẫu dò cho phản ứng lai Southern. Bộ kit Prime-It® RmT Random Primer Labelling Kit (Stratagene, La Jolla, CA, Mỹ) được sử dụng để tạo mẫu dò bằng đồng vị ^{32}P theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bước lai và rửa màng được thực hiện ở 65°C theo hướng dẫn của nhà sản xuất Bio-Rad, Hercules, CA, Mỹ. Các công đoạn trong phân tích Southern Blot được thực hiện tại Trung tâm chuyển gen thực vật thuộc Đại học Missouri, Hoa Kỳ.

Kỹ thuật Western blot

Các dòng đậu tương chuyển gen *codA* được kiểm tra với thuốc diệt cỏ để chọn các cây không mẫn cảm. Các cây này tiếp tục được xử lý hạn đối với cấu trúc *rd29A-codA*. Sau đó lá của các cây này được thu để tách và tiến hành kiểm tra biểu hiện protein bằng kỹ thuật Western blot với các bước cơ bản sau: (i) Protein tổng số từ mẫu lá được tách bằng dịch chiết PBS (phosphate-buffered saline) 0,05% Tween

20 theo tỉ lệ 1: 2 (gam mẫu: ml dịch chiết), ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút; (ii) Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide- SDS 10%; (iii) Chuyển protein trên gel điện di lên màng lai nitrocellulose bằng máy Pierce G2 Fast Blotter (25V, 1,3 mA trong 20 phút); (iv) Màng chứa kháng nguyên c-myc được phủ bằng 5% sữa tách béo pha trong dung dịch PBS + Tween 0,05% trong 16 giờ; (v) Lai kháng thể 1 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS 5% sữa tách béo có chứa kháng thể c-myc với độ pha loãng 700 lần, lắc ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ); (vi) Lai kháng thể 2 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS + 5% sữa tách béo có chứa kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (Horse Radish Peroxidase) trong 2 giờ); (vii) Hiện màu trong dung dịch có chứa cơ chất TMB (3,3',5,5'- tetramethyl benzidine) hoặc DAB (3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride), hiển thị kết quả dưới ánh sáng thường.

2.3.3.3. Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng cây chuyển gen trong điều kiện hạn nhân tạo

Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng cây chuyển gen

Các hạt đậu tương chuyển gen được khử trùng bề mặt bằng khí Cl_2 và được gieo trên môi trường MS có bổ sung vitamin, 2,5 g/l phytigel và các nồng độ PEG8000 khác nhau để đánh giá khả năng nảy mầm. Các đĩa hạt được đặt trong phòng nuôi có nhiệt độ 28°C và chu kỳ sáng/tối 16/8. Chiều dài rễ được ghi lại sau 12 ngày gieo trên môi trường xử lý.

Hạt của các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 và giống ĐT22 được trồng riêng biệt trong các chậu đất (115 x 85 x 105 cm). Tiến hành phết PPT để sàng lọc được các cây chuyển gen kháng chất diệt cỏ. Các cây chuyển gen kháng chất diệt cỏ của các dòng chuyển gen được chăm sóc đạt đến giai đoạn sinh trưởng V3 để đưa vào thí nghiệm chịu hạn nhân tạo. Điều kiện hạn nhân tạo được thiết đặt trong buồng sinh trưởng với nhiệt độ $30-33^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối đạt 60%. Điều kiện sinh trưởng đối chứng được thiết đặt song song trong buồng sinh trưởng độc lập khác ở nhiệt độ 28°C và độ ẩm tương đối đạt 80%; các cây trong điều kiện đối

chúng được chăm sóc bình thường trong suốt quá trình thí nghiệm. Các cây thí nghiệm được tưới đầy đủ một lần trước được đưa vào các điều kiện thí nghiệm.

Phân tích các chỉ số hóa sinh ở cây đậu tương chuyển gen trong các thí nghiệm chịu hạn

Hàm lượng GB tích lũy trong lá của các dòng đậu tương chuyển gen chịu hạn và không chịu hạn được xác định theo phương pháp của Grieve và Grattan (1983) [66]. Cụ thể: Nghiền mịn 0,5 g mẫu lá đã sấy khô, sau đó bổ sung 20 ml nước deion và lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ ở 25 °C. Dịch chiết được loại bỏ cặn và pha loãng với H₂SO₄ 2N theo tỷ lệ 1:1 và đặt trên đá trong 1 giờ. 0,50 ml hỗn hợp được đưa vào ống chứa sẵn 0,20 ml thuốc thử KI-I₂ lạnh (bao gồm 15,7g I₂ và 20,0 g KI hòa tan trong 100 ml nước deion) sau đó lắc đều. Hỗn hợp phản ứng được giữ ở 4°C trong 16 giờ và sau đó được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/ phút trong 10 phút ở 0°C. Loại bỏ cẩn thận dung dịch bằng micropipet. Cặn thu được được cho phản ứng với 9,0 ml thuốc thử 1,2-dichloroethane. Sau 2- 2,5 giờ, tiến hành đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 365 nm bằng máy đo quang phổ. Nồng độ GB trong các mẫu thí nghiệm được xác định dựa trên đường chuẩn của dung dịch GB chuẩn.

Chỉ số MDA, proline và hoạt độ POD theo phương pháp của Chen và Zhang (2016) [35]. Cụ thể:

Tách chiết dịch protein/enzyme tổng số: 0,2 g lá tươi được nghiền bằng nitor lỏng và chiết bằng 3 ml đệm chiết PBS pH7,8 lạnh trong 3-5 phút. Tiếp đó, ly tâm hỗn dịch ở 10000 vòng/ phút trong 20 phút ở 4°C. Dịch chiết được xác định nồng độ theo phương pháp Bradford và chia thành các phần nhỏ, bảo quản ở -80°C để sử dụng cho các phản ứng định lượng tiếp sau.

Xác định hàm lượng proline: Hàm lượng proline trong các mẫu thí nghiệm được xác định bằng dung dịch phản ứng có chứa 2,5% ninhydrin acid, 3% sulphosalicylic acid. Cụ thể: Lấy 50 µl mỗi dịch chiết protein/enzyme được cho vào ống phản ứng có chứa 1 ml dung dịch phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được đun sôi

cách thủy trong 15 phút và hạ nhiệt ngay lập tức trên đá trong 5 phút để dừng phản ứng. Sản phẩm phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis và nồng độ proline tích lũy ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) được xác định dựa trên đường chuẩn của L-proline.

Xác định hàm lượng malondialdehyde (MDA): Hàm lượng MDA sinh ra trong các mẫu lá thí nghiệm được xác định bằng dung dịch phản ứng có chứa 0,25% TBA, 9% TCA và 0,1M NaOH. Cụ thể: Lấy 100 μl mỗi dịch chiết protein/enzyme tổng số vào ống chứa 1 ml dung dịch phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được đun sôi cách thủy trong 15 phút và hạ nhiệt ngay lập tức trên đá trong 5 phút để dừng phản ứng. Sản phẩm phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 532nm và 600nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis. Nồng độ MDA được xác định theo công thức: $\text{MDA (nmol/g)} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \cdot V_r \cdot (V/V_t)}{155 \cdot 1000 / C_p}$. Trong đó, A_{532} : độ hấp thụ ở bước sóng 532 nm, A_{600} : độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm, V_r : thể tích hỗn hợp phản ứng, V : tổng thể tích dịch chiết thô, V_t : thể tích dịch chiết dùng phản ứng, C_p : nồng độ protein thô (mg/ml), 155: hệ số của MDA xác định bằng TBA ở bước sóng 532 ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Kiểm tra hoạt động POD: Hoạt động của enzyme POD được xác định thông qua độ biến thiên hấp thụ ở bước sóng 470nm qua mỗi 15 giây trong vòng 1 phút của 50 μl dịch chiết trong dung dịch phản ứng chứa 0,2% guaiacol được hòa tan trong đệm PBS 100mM pH 7,0 và H_2O_2 . Chuẩn bị thuốc thử: 100 mM PBS (pH 7,0) 0,2%, guaiacol 30% H_2O_2 . Hoạt độ POD được xác định theo công thức: Hoạt độ POD (U/g protein) = $\Delta A_{470} \times (V/V_t) / (0,01 \times t) / C_p$. Trong đó, ΔA_{470} : là sự biến thiên độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm qua mỗi 15 giây, V : tổng thể tích dịch chiết, V_t : thể tích dịch chiết dùng để phản ứng; t : thời gian phản ứng (phút), C_p : nồng độ protein xác định theo phương pháp Bradford (mg/ml), 0,01: Một đơn vị POD (được xác định là lượng enzyme làm tăng 0,01 độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm trong mỗi phút).

2.3.4. Phân tích và xử lý dữ liệu

Các số liệu thống kê được phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS. Giá trị

trung bình và độ lệch chuẩn (SD) được tính toán sau ba lần lặp lại. Giá trị kiểm nghiệm t-test được so sánh với độ tin cậy 95%.

2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen, chuyển gen và phân tích biểu hiện gen được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong thời gian từ năm 2017 đến tháng 4 năm 2020.

Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học và 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

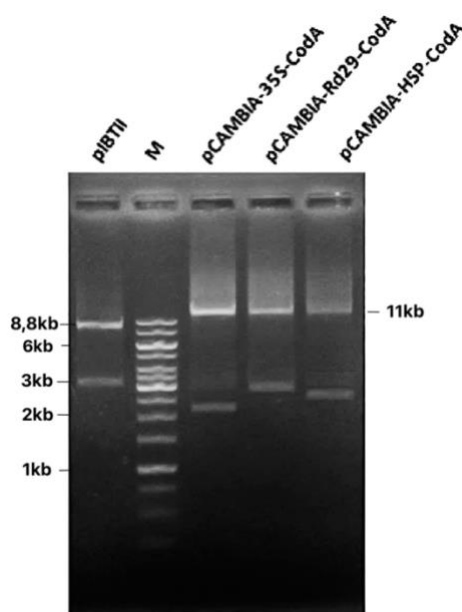
3.1. THIẾT KẾ VÀ BIỂU HIỆN VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN *codA*

Để chuyển gen *codA* vào cây đậu tương và có thể kiểm tra biểu hiện sản phẩm protein tái tổ hợp của gen, ba vector biểu hiện gen thực vật *pBTII* mang promoter 35S, *rd29A* và *HSP* tương ứng để điều khiển biểu hiện gen *codA* ở cây đậu tương đã được thiết kế. Vector chuyển gen *codA* được thiết kế theo sơ đồ cấu trúc hình 2.1 chương 2, gồm hai bước: tạo cấu trúc mang gen *codA* và gắn cấu trúc mang gen *codA* đã thiết kế vào vector chuyển gen.

3.1.1. Tạo cấu trúc chuyển gen *codA*

3.1.1.1. Mở vòng vector chuyển gen *pIBTII* và thu nhận cấu trúc mang gen chuyển *codA* với *HindIII* và *EcoRI*

Sau khi tiến hành tách chiết và tinh sạch, các vector *pIBTII* và *pCAMBIA-HSP-codA*, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA* được cắt bằng hai enzyme *HindIII* và *EcoRI*. Cấu trúc và kích thước của vector *pIBTII* và vector *pCAMBIA* mang gen chuyển *codA* được thể hiện trong hình 3.1.



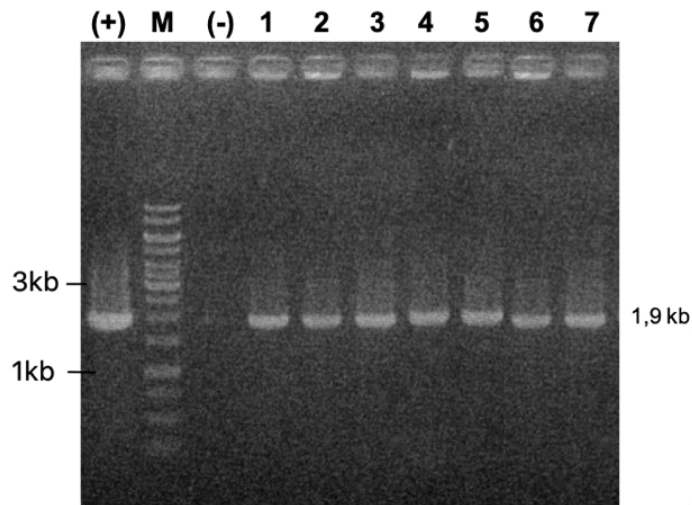
Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm cắt vector *pIBTII* và *pCAMBIA* bằng enzyme *HindIII* và *EcoRI* (M: thang DNA 1kb)

Kết quả phân tích hình ảnh điện di ở hình 3.1 cho thấy, các plasmid đã bị cắt hoàn toàn thành hai băng đúng với kích thước lý thuyết. Vector *pIBTII* bị cắt thành hai băng 8,8 kb và 3 kb; các vector *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA*, *pCAMBIA-HSP-codA* bị cắt thành các băng có kích thước khoảng 11 kb và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb tương ứng với kích thước của *pCAMBIA* và cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *Rd29A-codA*, *HSP-codA*.

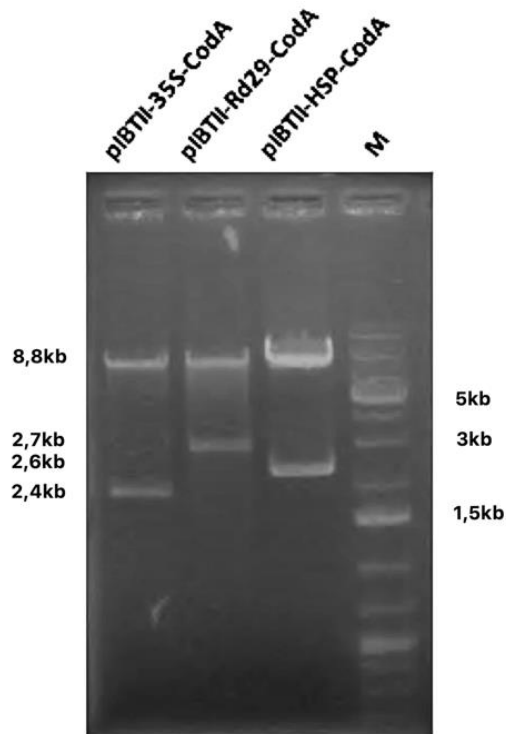
3.1.1.2. Gắn cấu trúc mang gen chuyển *codA* vào vector chuyển gen *pIBTII*

Phân đoạn của vector chuyển gen *pIBTII* và phân đoạn của cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* được ghép nối với nhau bằng phản ứng T4 ligase. Sản phẩm ligase được biến nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E. coli* DH5 α bằng sốc nhiệt. Sau 16h nuôi cấy trải dịch khuẩn trên đĩa thạch LB chứa kháng sinh spectinomycin 50 mg/l thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Một số khuẩn lạc được kiểm tra colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *codA-F/codA-R* để lựa chọn dòng *E. coli* DH5 α mang vector chuyển gen *codA*. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR hình 3.2 cho thấy, 7 dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều dương tính với colony-PCR, băng điện di thu được có kích thước 1,9 kb tương ứng với kích thước của vector chuyển gen *codA* đã tính toán lý thuyết ban đầu. Như vậy, vector chuyển gen *codA* đã được chuyển vào trong tế bào vi khuẩn *E. coli*.

Để xác thực thêm độ chính xác của vector mới thiết kế, lấy ngẫu nhiên ba dòng khuẩn lạc dương tính chứa vector *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* tương ứng nuôi lỏng và tách plasmid. Plasmid được cắt với enzyme *HindIII* và *EcoRI*. Kết quả phân tích điện di sản phẩm cắt trong hình 3.3 cho thấy, xuất hiện hai băng gần với băng 8,8 kb của *pIBTII* và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb của *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA*, *pCAMBIA-HSP-codA* chứng tỏ các dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều mang vector cần thiết kế. Toàn bộ 7 dòng khuẩn lạc dương tính này được nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc (spectinomycin) để nhân dòng vector tái tổ hợp cho biến nạp vào *A. tumefaciens* phục vụ chuyển gen.



Hình 3.2. Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn *E. coli* chứa các vector thiết kế
M: Marker 1Kb; (+): đối chứng dương; (-): đối chứng âm; 1,2: Khuẩn lạc *pIBTII-35S-codA*; 3-5: Khuẩn lạc *pIBTII-rd29A-codA*; 6,7: Khuẩn lạc *pIBTII-HSP-codA*

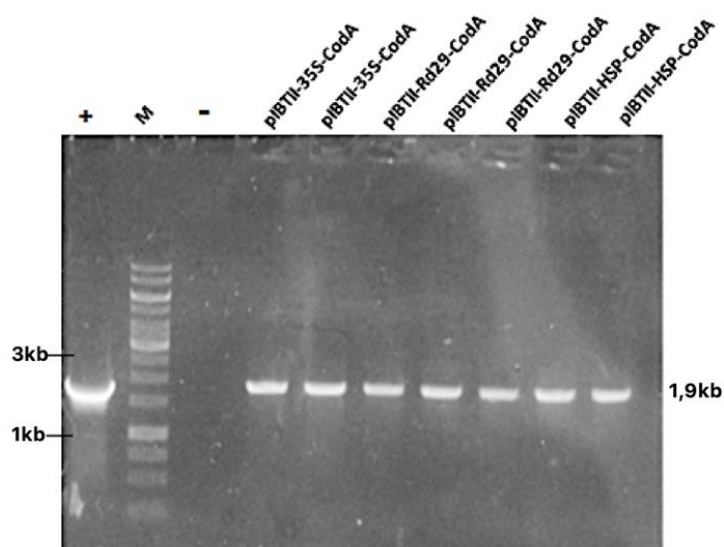


Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm cắt kiểm tra plasmid *pIBTII* mang các cấu trúc gen thiết kế

3.1.1.3. Tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58 chứa vector chuyển gen *codA*

Các plasmid chứa vector chuyển gen *codA* tách chiết từ các dòng vi khuẩn *E. coli* dương tính với colony-PCR được tinh sạch, sau đó được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58 bằng phương pháp xung điện. Sau khi biến nạp, dịch khuẩn được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh spectinomycin 50 mg/l và rifamicin 50 mg/l, nuôi ở 28°C trong 48 giờ. Kết quả biến nạp cho thấy, nhiều dòng khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường có kháng sinh chọn lọc. Khuẩn lạc được sàng lọc, kiểm tra lại bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho gen *codA*. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 loại vector chuyển gen được thể hiện trong hình 3.4.

Ảnh điện di hình 3.4 cho thấy, một băng duy nhất kích thước 1,9 kb tương ứng với băng đối chứng dương và đúng với tính toán lý thuyết. Như vậy, trên cơ sở sử dụng vector *pIBTII*, ba vector chuyển gen *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58. Các dòng khuẩn với ba cấu trúc chuyển gen khác nhau này được bảo quản sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.



Hình 3.4. Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn *A. tumefaciens* C58 mang các cấu trúc gen thiết kế

3.1.2. Đánh giá hoạt động của vector mang gen chuyển *codA* trên cây thuốc lá

3.1.2.1. Tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

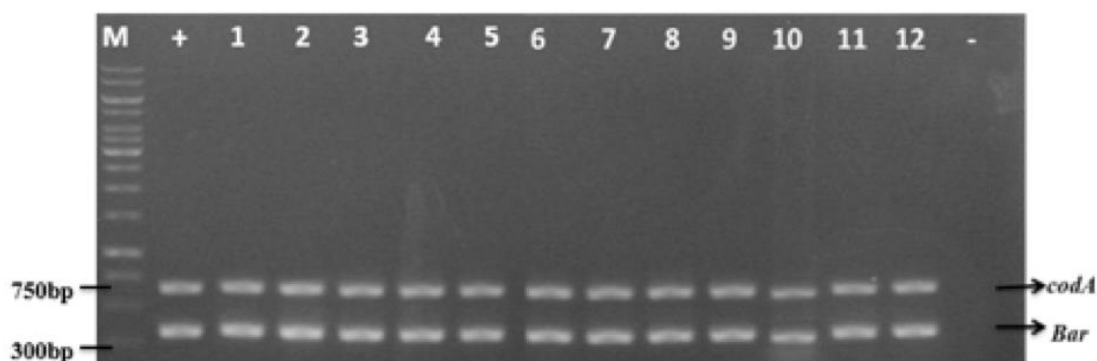
Nhằm mục đích kiểm tra hoạt động của vector chuyển gen *codA*, các cấu trúc mang gen *codA* tiếp tục được chuyển vào cây mô hình thuốc lá giống K326 và đánh giá hiệu quả chọn lọc của gen *Bar*. Kết quả thí nghiệm biến nạp trình bày ở bảng 3.1 cho thấy, tỷ lệ số chồi tái sinh sau khi chuyển gen và chọn lọc cao ở cả ba cấu trúc *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* đạt 88,0%, 90,0%, 92,0% tương ứng và các chồi của 3 cấu trúc có tỷ lệ sống sót trên môi trường tạo rễ có bổ sung PPT từ 42,64- 54,23%. Ngược lại, các mảnh lá đối chứng có tỷ lệ phát sinh chồi chỉ đạt 27,0%, các chồi nhỏ và chết vàng sau 2 tuần biến nạp. Các dòng thuốc lá chuyển gen sống sót sau chọn lọc bằng PPT được ra cây bằng giá thể TN1 trong điều kiện nhà lưới. Sau 30 ngày, lá non được thu mẫu, tách chiết DNA tổng số và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *codA* bằng phương pháp PCR với 2 cặp mồi *codA F/R* và *bar F/R*, kết quả được thể hiện ở hình 3.5.

Bảng 3.1. Kết quả biến nạp gen *codA* vào giống thuốc lá K326 sử dụng PPT sàng lọc

Cấu trúc	Số mẫu biến nạp (mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi)	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Tỷ lệ sống sau khi ra cây (%)
<i>Hsp-codA</i>	100	88,00	118	54,23	56,25
<i>rd29A-codA</i>	100	92,00	136	42,64	65,51
<i>35S-codA</i>	100	90,00	112	50,00	62,50
ĐC	100	27,00	0	0	0

Kết quả phân tích điện di hình 3.5 cho thấy, băng điện di có kích thước khoảng 750 bp và 400 bp phù hợp với kích thước của đoạn gen *codA* và gen *bar*.

Như vậy, 100% các cây thuốc lá kiểm tra đều mang gen chuyển.



Hình 3.5. Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá chuyển gen
M: marker 1 kb, giếng +: đối chứng dương, giếng 1 -5: các dòng chuyển gen cấu trúc rd29A-codA, giếng 6 - 9: các dòng chuyển gen cấu trúc 35S-codA, giếng 10-12: các dòng chuyển gen cấu trúc HSP-codA giếng -: đối chứng âm.

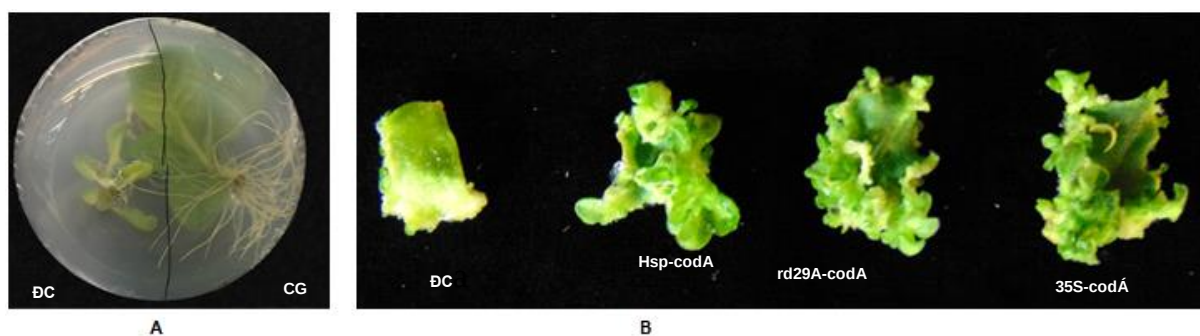


Hình 3.6. Chồi thuốc lá chuyển gen chọn lọc trên môi trường bổ sung PPT 1,5 mg/l

3.1.2.2. Kết quả đánh giá và phân tích các dòng thuốc lá chuyển gen

Các dòng thuốc lá chuyển gen tiếp tục gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% *in vitro* nhằm bước đầu đánh giá sự hoạt động của gen *codA* trong cây thuốc lá chuyển gen. Riêng đối với các chồi và các mảnh thuốc lá chứa vector chuyển gen *HSP-codA* được điều khiển bởi promoter *HSP* là promoter cảm ứng nhiệt nên các mảnh lá và chồi được tiến hành sốc nhiệt ở 37°C trong thời gian 3 ngày. Ở giai đoạn gây hạn 7 ngày và 14 ngày, các mảnh lá của thuốc lá chuyển gen đều xanh và

tạo chồi còn các mảnh lá của cây đối chứng chuyển màu vàng và tạo chồi rất ít. Các chồi thuốc lá chuyển gen được chuyển sang môi trường chịu hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% và cho tỷ lệ tạo rễ trung bình trên 96% sau 10 ngày cấy chuyển và các chồi cây đối chứng tạo rễ ít hoặc không tạo rễ, cây còi cọc không phát triển được (hình 3.7). Kết quả trên nhận thấy, các cây thuốc lá chuyển gen ở trong môi trường hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% có khả năng duy trì áp suất thẩm thấu, phát triển mạnh bộ rễ để tăng cường sức chống chịu, các cây đối chứng trong môi trường hạn nhân tạo bị mất cân bằng áp suất thẩm thấu dẫn đến còi cọc và chết.



Hình 3.7. Kết quả gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% các dòng thuốc lá chuyển gen

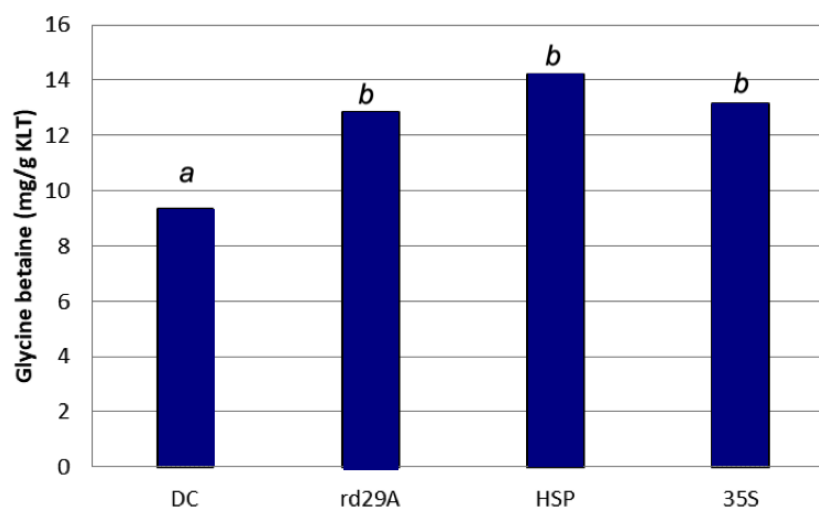
A) chồi tạo rễ trên môi trường hạn sinh lý;

B) các mảnh lá tạo chồi trên môi trường hạn sinh lý

(ĐC: Đối chứng; CG: chuyển gen; HSPcodA, rd29AcodA, 35ScodA: các dòng chuyển gen)

Tiến hành gây hạn nhân tạo cho các dòng cây chuyển gen trong nhà lưới, thí nghiệm được thực hiện trong buồng sinh trưởng ở 37°C, độ ẩm 55% và hoàn toàn không tưới nước trong suốt thời gian thí nghiệm. Sự tích lũy GB dưới điều kiện hạn được đánh giá vào ngày thứ 7 của thí nghiệm. Kết quả phân tích định lượng cho thấy các dòng chuyển gen tích lũy một lượng đáng kể hàm lượng GB thể hiện trong hình 3.8. Kết quả định lượng GB tích lũy trong điều kiện hạn ở hình 3.8 cho thấy, trong cùng điều kiện xử lý hạn, các cây chuyển gen *codA* mang các vector chuyển gen điều khiển bởi các promoter cảm ứng khác nhau sẽ cho kết quả tích lũy hàm lượng GB khác nhau. Cây chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn so với cây đối

chứng cụ thể lượng GB tích lũy trung bình của các cây chuyển gen dòng *rd29A-codA*, *HSP-codA*, *35S-codA* lần lượt là 12,43 mg/g khối lượng khô (mg/g KLK), 13,89 mg/g KLK, 12,89 mg/g KLK, so với hàm lượng GB tích lũy của cây đối chứng là 9,88 mg/g KLK.



Hình 3.8. Kết quả định lượng hàm lượng GB trong các dòng thuốc lá chuyển gen
(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

Như vậy, trong điều kiện hạn, sự biểu hiện của gen *codA* đã cải thiện khả năng chịu hạn của cây chuyển gen so với cây đối chứng nhờ việc tích lũy một lượng lớn GB. Kết quả này phù hợp với quan sát đánh giá kiểu hình của các dòng thuốc lá sau 7 ngày gây hạn nhân tạo; trong đó, các dòng thuốc lá chuyển gen vẫn sinh trưởng tốt còn các cây đối chứng không chuyển gen bị héo sau ngày gây hạn thứ 3 và chết sau 7 ngày gây hạn. Như vậy, từ kết quả phân tích trên cây thuốc lá có thể kết luận, ba vector chuyển gen *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* thiết kế đều hoạt động tốt trong cây thuốc lá chuyển gen và có thể sử dụng làm vật liệu để chuyển gen vào cây đậu tương cũng như các cây trồng khác.

3.1.3. Thảo luận kết quả thiết kế vector và hoạt động của vector biểu hiện trên cây thuốc lá

Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của kỹ thuật tạo cây

chuyển gen là khâu thiết kế vector biểu hiện với cấu trúc hoàn chỉnh và phù hợp với tế bào cây chủ. Sự biểu hiện của gen chuyển trong thực vật chuyển gen được kiểm soát thông qua hoạt động của promoter (trình tự khởi động) và terminator (yếu tố kết thúc). Promoter là một trình tự nucleotide phía đầu 5' của điểm khởi đầu phiên mã có cấu trúc phức tạp, chứa nhiều yếu tố đặc trưng tham gia điều hòa sự biểu hiện gen ở mức độ phiên mã [6]. Trong quá trình hoạt động của gen, promoter đóng vai trò như một công tắc đóng mở gen. Promoter đóng vai trò then chốt trong việc biểu hiện gen đích, giúp xác định thời gian, vị trí các gen được hoạt động trong các mô, tế bào hoặc giai đoạn sinh trưởng và mức độ biểu hiện của gen đích [47].

Hiện nay, có rất nhiều loại promoter được sử dụng trong việc điều khiển hoạt động của gen chuyển trong thực vật chuyển gen. Promoter 35S có nguồn gốc từ virus gây bệnh khảm lá súp lơ (CaMV), là một promoter mạnh được sử dụng khá phổ biến để khởi động phiên mã cho gen trong tất cả các loại mô bào thực vật [149]. Trong khi đó, để nâng cao khả năng chịu hạn và nhiệt độ cao, promoter *HSP* và *rd29A* cũng được ưu tiên sử dụng. Promoter *HSP* là promoter cảm ứng nhiệt được phân lập từ cây *Arabidopsis* hoạt động ở nhiệt độ cảm ứng tối ưu khác nhau tùy thuộc vào từng đối tượng thực vật và phương thức cảm ứng nhiệt [7]. Còn promoter *rd29A* là một promoter cảm ứng khô hạn được sử dụng điều chỉnh gen *rd29A* ở *Arabidopsis* để đáp ứng lại sự mất nước, nhiệt độ thấp, muối cao... Promoter *rd29A* có vai trò điều hòa hoạt động gen chuyển, nhằm mục đích tăng cường hoạt động gen từ đó tăng cường khả năng chống chịu với stress phi sinh học của cây trồng. Vì vậy, hiện nay, promoter *rd29A* thường được sử dụng trong thiết kế vector chuyển gen liên quan đến tính chịu hạn, nhằm tăng cường tính chống chịu của cây chuyển gen với các stress phi sinh học [108].

Promoter là yếu tố đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát quá trình biểu hiện của gen. Việc nghiên cứu cấu trúc, chức năng và các yếu tố liên quan của promoter cho thấy khả năng thay đổi kết quả biểu hiện gen trong sinh vật cũng như các gen quan tâm. Trong nghiên cứu này, promoter 35S, *HSP*, *rd29A* được lựa chọn

và là thành phần của cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* trong vector chuyển gen *pIBTII*. Trong điều kiện khô hạn, sự hoạt động mạnh của ba loại vector này sẽ giúp gen chuyển *codA* khởi động phiên mã tổng hợp choline oxidase, enzyme chìa khoá xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp GB từ choline trong cây đậu tương chuyển gen. Sự tích lũy hàm lượng GB trong cây đậu tương chuyển gen giúp điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào, giảm stress oxy hoá, từ đó tăng cường khả năng chống chịu hạn ở cây đậu tương chuyển gen *codA*.

Một quy trình biến nạp gen hiệu quả không thể thiếu sự lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả để phân biệt giữa tế bào chuyển gen và không chuyển gen. Các gen kháng thuốc kháng sinh hoặc kháng thuốc diệt cỏ thường được lựa chọn và sử dụng cho mục đích này. Ở thực vật, các gen kháng thuốc diệt cỏ thường được mã hoá cho một protein tái tổ hợp không miễn cảm với thuốc diệt cỏ hoặc một loại enzyme có thể khử độc tố của chất diệt cỏ. PPT là một loại thuốc diệt cỏ không chọn lọc, ức chế hoạt động của glutamine synthetase cùng hai gốc L-alanin gây ra sự tích tụ quá mức amoniac ở thực vật bậc cao [42]. Gen chỉ thị chọn lọc *bar* có khả năng kháng thuốc diệt cỏ PPT [97]. Gen *bar* đã được sử dụng rộng rãi và là chỉ thị lý tưởng để xác định các mô chuyển gen đã được sử dụng trong vector chuyển gen *codA*. Gen *bar* mã hoá cho phosphinothricin acetyltransferase (PAT), chuyển đổi PPT thành dạng acetyl hóa không diệt cỏ bằng cách chuyển nhóm acetyl từ acetyl-CoA trên nhóm amin tự do của PPT. Gen *bar* thường được sử dụng như một chỉ thị chọn lọc ở một số loài thực vật. Theo Bành Thị Mai Anh và cs (2014), sử dụng chất chọn lọc là kanamycin cho thấy tỷ lệ tạo chồi chuyển gen đạt 83% và tỷ lệ các chồi chuyển gen tạo rễ là khoảng 95%. Tuy nhiên, từ kết quả phân tích PCR, tác giả cũng báo cáo rằng, tỷ lệ cây chuyển gen thu được chỉ đạt 52% trên tổng số các cây được kiểm tra [1]. So với việc sử dụng kháng sinh làm chất chọn lọc, nghiên cứu của luận án cho thấy việc sử dụng PPT làm chất chọn lọc cho thấy hiệu quả chọn lọc cao hơn. Ở giai đoạn mô sẹo, kanamycin dường như kém hiệu quả hơn PPT trong việc ức chế sự phát triển của các mô sẹo không biến nạp [42].

Thực vật chuyển gen *bar* có khả năng kháng lại chất diệt cỏ cả trong nhà kính và điều kiện đồng ruộng. Vì vậy, gen *bar* có thể được sử dụng để sàng lọc các thể hệ của dòng chuyển gen trong chọn tạo giống cây trồng. Khả năng kháng thuốc diệt cỏ của gen *bar* có thể được theo dõi bằng cách phun PPT trực tiếp lên cây con hoặc bôi PPT cục bộ lên lá [42]. Ngoài ra, để phát hiện và định lượng protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen bằng kỹ thuật Western blot, cấu trúc mang gen chuyển *codA* còn được gắn thêm đoạn DNA mã hóa kháng nguyên *cmv* - một lựa chọn phổ biến, kinh tế và hiệu quả của nhiều nghiên cứu hiện nay [177].

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) đã trở thành một hệ thống mô hình cho nuôi cấy mô và kỹ thuật di truyền trong nhiều thập kỷ qua và được sử dụng để nghiên cứu chức năng gen mới. Ở cây thuốc lá, hệ thống tái sinh *in vitro* tương đối đơn giản, thời gian phân hóa từ mô đến cây hoàn chỉnh khá ngắn. Vì vậy, thuốc lá thường được sử dụng nhằm tối ưu hóa quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* [60]. Những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương sử dụng thuốc lá làm cây mô hình đã được công bố, như công trình chuyển gen *codA* của Bùi Thị Thu Hương và cs (2019) [78], gen *GmCHI1A* của Lê Thị Hồng Trang và cs (2019) [10]; gen *GmEXP1* của Lo và cs (2015) [100]; *GmDREB2* của Tan và cs (2015) [153]... Theo cách tiếp cận này, luận án đã sử dụng thuốc lá làm cây mô hình để đánh giá hoạt động của vector biểu hiện mang gen chuyển *codA* trước khi chuyển vào cây đậu tương nhằm nâng cao khả năng chịu hạn. Kết quả biểu hiện gen *codA* ở cây thuốc lá đạt hiệu suất chuyển gen 42,64- 54,23% là cơ sở vững chắc để tiếp tục thực hiện biểu hiện gen *codA* vào cây đậu tương và các cây trồng khác.

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN *codA* Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

Hiện nay, đối với cây đậu tương, nhiều quy trình chuyển gen đã được áp dụng. Tuy nhiên, hiệu suất chuyển gen khác nhau và phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống; nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen như nồng độ khuẩn,

thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens* và đồng nuôi cấy, nồng độ chất chọn lọc.... Do đó, việc cần thiết là lựa chọn được các điều kiện chuyển gen phù hợp với kiểu gen của giống ĐT22. Trong quá trình thiết kế vector chuyển gen *codA* và thực hiện biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *codA* vào cây thuốc lá mô hình nhận thấy, trong số ba vector chuyển gen đã thiết kế, cấu trúc chuyển gen *rd29A-codA* cho tỷ lệ ra cây chuyển gen cao nhất với biểu hiện mạnh của promoter cảm ứng hạn *rd29A*. Vì vậy, cấu trúc chuyển gen *rd29A-codA* đã được lựa chọn và sử dụng làm vật liệu nghiên cứu nhằm thăm dò các điều kiện chuyển gen thích hợp vào giống đậu tương ĐT22.

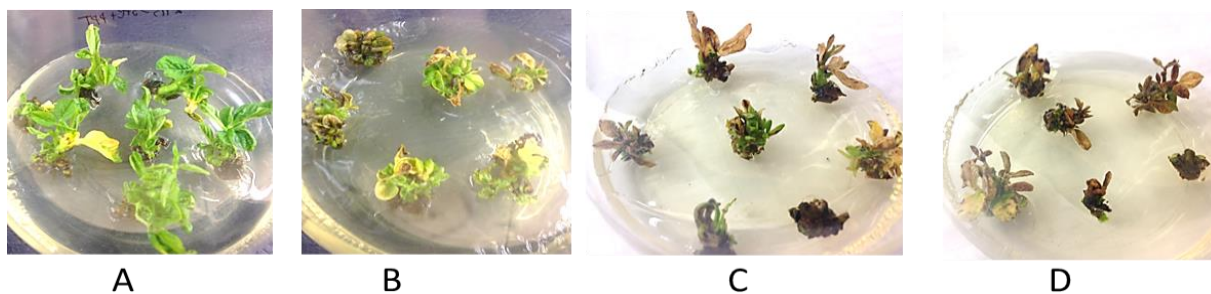
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tạo chồi đậu tương

Để xác định hàm lượng PPT sử dụng chọn lọc các chồi chuyển gen thí nghiệm, hạt nảy mầm sau khi gieo 5 ngày thu lá mầm và tiến hành gây tổn thương tại nách lá mầm và không lây nhiễm khuẩn, đồng nuôi cấy 5 ngày trên môi trường CCM sau đó được cảm ứng tạo chồi trên các môi trường SIM: ở môi trường SIM không bổ sung chất chọn lọc PPT sau 2 tuần cảm ứng tạo chồi (SIM1). Sau đó các cụm chồi tiếp tục được chuyển sang môi trường SIM có bổ sung PPT (SIM2) với 5 ngưỡng nồng độ (0; 1; 3; 5; 7) mg/l. Theo dõi sau hai tuần, kết quả được trình bày ở bảng 3.2 và hình 3.9.

Sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM2 có chứa PPT 0 mg/l và 1 mg/l, các cụm chồi xanh và phát triển bình thường, trong khi đó, lá của các cụm chồi bắt đầu có hiện tượng úa vàng và rụng từ ngày thứ 7 trên môi trường SIM2 có chứa PPT 3-5 mg/l; còn trên môi trường SIM2 có chứa PPT 7 mg/l, các cụm chồi chết khô hoàn toàn. Sau khoảng 30 ngày, cụm chồi trên môi trường bổ sung nồng độ PPT 3 mg/l sinh trưởng phát triển chậm, nhưng có hiện tượng tạo cụm chồi mới và xanh. Ở nồng độ PPT 5 mg/l, chồi chết hoàn toàn. Từ các kết quả phân tích trên, môi trường SIM bổ sung PPT 3,0 mg/l đã được lựa chọn để chọn lọc cây đậu tương chuyển gen.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tạo chồi

Nồng độ PPT mg/l	Số mảnh lá mầm thí nghiệm	Môi trường chọn lọc		
		Số mảnh lá trên môi trường SIM1 sau 14 ngày	Số cụm chồi trên môi trường SIM2 sau 14 ngày	Số cụm chồi trên môi trường SEM sau 14 ngày
0	100	82	82	78
1	100	83	45	38
3	100	86	23	16
5	100	79	16	0
7	100	81	0	0

**Hình 3.9.** Các mảnh lá mầm trên môi trường chọn lọc SIM2 với nồng độ PPT khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy

A: 1 mg/l; B: 3 mg/l; C: 5 mg/l; D: 7 mg/l

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn và thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

3.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

Để xác định nồng độ khuẩn *Agrobacterium* ở OD₆₅₀ sử dụng cho chuyển gen vào đậu tương, các mảnh lá mầm hạt đậu tương đã được làm tổn thương tại nách lá mầm đã được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ khác nhau, lần lượt là 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 trong vòng 30 phút, sau đó tiến hành đồng nuôi cấy các mảnh lá mầm đã lây nhiễm trên môi trường CCM. Sau 5 ngày đồng nuôi cấy, các mảnh lá mầm được rửa khuẩn và được cấy chuyển lên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM1 không chứa chất chọn lọc trong vòng 14 ngày, sau đó được chuyển sang môi trường SIM2 có bổ sung PPT 3 mg/l. Sau 14 ngày, mảnh lá mầm tiếp tục được chuyển sang môi trường SEM có chứa PPT 1,5 mg/l, kết quả trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi

Nồng độ <i>Agrobacterium</i> đo ở OD ₆₅₀	Số mảnh lá mầm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 không bổ sung PPT sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 bổ sung PPT 3,0 mg/l sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM bổ sung PPT 1,5 mg/l sau 14 ngày
0,4	60	48	12	5
0,6	60	45	18	17
0,8	60	29	11	6
1,0	60	20	10	4
Tổng	240	98	55	32

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM1 không chứa PPT, không thấy sự sai khác nhiều về khả năng tạo chồi của mảnh lá

mầm khi được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,4 và 0,6. Đối với các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,8 và 1,0, tỷ lệ tái nhiễm khuẩn của các mảnh lá mầm rất cao, các mảnh lá mầm thường chết và không tạo đa chồi. Các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ là 0,4 và 0,6 tiếp tục được chọn lọc trên môi trường SIM2 và SEM có bổ sung PPT. Sau 14 ngày nuôi cấy chọn lọc, các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ 0,6 vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát sinh chồi, trong khi các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ 0,4 gần như chết hoàn toàn trên môi trường chọn lọc. Vì vậy, dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ đạt 0,6 đã được lựa chọn để sử dụng cho biến nạp.

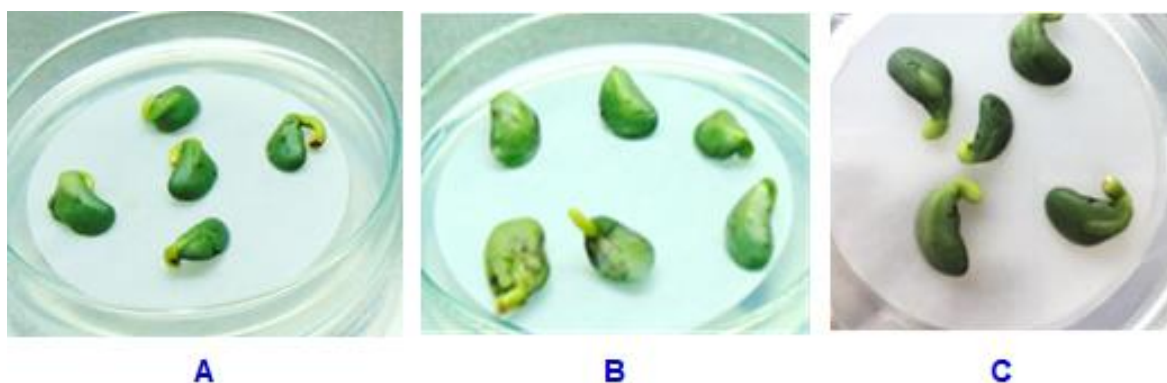
3.2.2.2. Ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens* và đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen ở giống đậu tương DT22 được thực hiện với các khoảng thời gian ủ lần lượt là: 15 phút; 30 phút; 45 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, 5 ngày và 8 ngày, kết quả được trình bày ở bảng 3.4.

Kết quả bảng 3.4 cho thấy, với thời gian lây nhiễm 15 phút, các cụm mầm bị chết gần như hoàn toàn ở giai đoạn cuối của chọn lọc lần 1; thời gian lây nhiễm 45 phút, tỷ lệ nhiễm lại khuẩn rất cao và loại bỏ nhiều ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi SIM1. Ở thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, các mảnh lá mầm nhỏ hơn nhiều so với đồng nuôi cấy 5 ngày và 8 ngày, nhưng với thời gian đồng nuôi cấy 8 ngày khuẩn mọc lại rất cao đến ngày thứ 6 của đồng nuôi cấy khuẩn mọc lan ra ngoài của giấy lọc và đến ngày thứ 8 một số mảnh bị thối (Hình 3.10). Vì vậy, thời gian lây nhiễm 30 phút và đồng nuôi cấy 5 ngày cho kết quả tốt nhất để sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương DT22.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi

Thời gian ngâm mảnh lá mầm trong dịch khuẩn (phút)	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Số mảnh lá mầm làm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 không bổ sung PPT sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 bổ sung PPT 3,0 mg/l sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM bổ sung PPT 1,5 mg/l sau 14 ngày
15	2	90	88	21	0
	5	90	86	26	4
	8	90	38	18	0
30	2	90	84	31	13
	5	90	76	68	38
	8	90	35	12	0
45	2	90	42	30	0
	5	90	31	13	0
	8	90	17	8	0



Hình 3.10. Các mảnh lá mầm sau các thời gian đồng nuôi cấy khác nhau

A: 2 ngày; B: 5 ngày; C: 8 ngày

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi đậu tương

Xác định nồng độ kháng sinh và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy là yếu tố quan trọng đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau khi được lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Sử dụng kháng sinh diệt khuẩn phổ rộng cefotaxime với nồng độ lần lượt là 200 mg/l, 500 mg/l và 1000 mg/l bổ sung vào môi trường rửa khuẩn (SIM lỏng) với thời gian rửa 5 phút, 10 phút và 15 phút.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến khả năng diệt khuẩn và tạo chồi của các mảnh lá mầm sau chuyển gen

Thời gian diệt khuẩn (phút)	Kháng sinh diệt khuẩn) cefotaxime (mg/l)	Số mảnh lá mầm thí nghiệm	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM1 không bổ sung PPT sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM2 bổ sung PPT 3,0 mg/l sau 14 ngày	Số mảnh lá mầm cảm ứng tạo chồi trên môi trường SEM bổ sung PPT 1,5 mg/l sau 14 ngày
5	200	60	28	31	6
	500	60	36	46	8
	1000	60	18	18	3
10	200	60	38	26	13
	500	60	46	38	24
	1000	60	12	9	0
15	200	60	17	14	8
	500	60	17	13	0
	1000	60	8	5	0

Các mảnh lá mầm sau khi đồng nuôi cấy 5 ngày, gấp nhẹ vào bình tam giác 250 ml rửa bằng nước cất khử trùng 3 lần thời gian 2 phút/lần, tiếp tục rửa 1 lần với môi trường SIM lỏng có bổ sung kháng sinh ở các nồng độ khác nhau và thời gian khác nhau. Sau đó, cấy chuyển trên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM1 trong thời gian 14 ngày; tiếp tục chuyển sang môi trường SIM2 và SEM1 chứa chất chọn lọc PPT lần lượt trong thời gian 14 ngày.

Kết quả qua từng giai đoạn cho thấy, nồng độ cefotaxime 500 mg/l được bổ sung vào môi trường diệt khuẩn rửa trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất. Ở nồng độ cefotaxime 1000 mg/l, các mảnh lá mầm tạo đa chồi kém, tại vị trí nách lá mầm sau khi tạo tổn thương bị đen và không tạo được cụm đa chồi. Ở nồng độ cefotaxime 200 mg/l, các mảnh lá mầm bị tái nhiễm khuẩn rất cao, chỉ sau tuần đầu cảm ứng tạo chồi, hầu hết các mảnh đều bị nhiễm lại khuẩn.

3.2.4. Thảo luận kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* ở giống đậu tương DT22

Đậu tương là loại cây trồng nhạy cảm với các stress phi sinh học và được coi là cây chống chịu kém với các yếu tố bất lợi từ môi trường. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen để nâng cao khả năng chống chịu các stress phi sinh học ở đậu tương đang được quan tâm nghiên cứu. Hiện nay, nhiều quy trình chuyển gen đã được áp dụng đối với cây đậu tương, nhưng phổ biến là biến nạp gen bằng lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn một số hạn chế cần được khắc phục như thao tác tạo tổn thương cần có độ chính xác cao, nồng độ vi khuẩn sử dụng cho biến nạp cần tối ưu theo từng chủng, nồng độ chất chọn lọc sử dụng cho chọn lọc cây chuyển gen. Ngoài ra, hiệu quả chuyển gen còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống đậu tương. Cho đến nay, ở Việt Nam, một số nghiên cứu chuyển gen vào các giống đậu tương DT84, DT2008 nhằm tăng tích lũy proline và isoflavone với hiệu suất chuyển gen khác nhau giữa các giống đậu tương đã được công bố [110], [112]. Chính vì vậy, việc nghiên cứu điều kiện chuyển gen thích hợp với kiểu gen của mỗi giống được chú ý quan tâm bởi các nhà

nghiên cứu khi chuyển gen ở đậu tương. Kết quả nghiên cứu của luận án đã chỉ ra những ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 của Việt Nam, bao gồm nồng độ PPT, nồng độ khuẩn, thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens*, thời gian đồng nuôi cấy, nồng độ kháng sinh chọn lọc và thời gian diệt khuẩn.

Lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả để nhận biết giữa tế bào chuyển gen và không chuyển gen bằng cách ức chế tăng sinh và tái tạo là một bước quan trọng trong một quy trình biến nạp gen. Hiện nay, gen chỉ thị chọn lọc thường được lựa chọn và sử dụng là các gen kháng kháng sinh hoặc kháng thuốc diệt cỏ. Trong số đó, gen *bar* hoặc gen *pat* được phân lập từ *Streptomyces hygroscopicus* mã hóa phosphinothricin acetyltransferase, có khả năng acetyl hóa nhóm NH₂ của thuốc diệt cỏ PPT khiến thuốc trở nên vô hại là tác nhân chọn lọc có hiệu quả cao [97]. Thực vật mang gen chỉ thị chọn lọc *bar* hoặc *pat* có khả năng kháng thuốc diệt cỏ dựa trên PPT. Gen *bar* và *pat* đã được sử dụng rộng rãi như các chỉ thị trong thực vật chuyển gen và là công cụ lý tưởng để xác định các mô chuyển gen, thậm chí cả trong điều kiện nhà kính hoặc đồng ruộng. Mức độ nhạy cảm của vật liệu thực vật với PPT phụ thuộc vào kiểu gen và loại mẫu cấy, điều kiện chọn lọc hoặc thành phần của môi trường chọn lọc [90]. Ở phạm vi nồng độ từ 1- 10 mg/l, PPT phù hợp để lựa chọn tế bào được biến nạp với gen *bar* ở hầu hết các loài thực vật [97]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, sử dụng PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM cho hiệu quả chọn lọc cao nhất.

Bên cạnh đó, nồng độ khuẩn khi lây nhiễm, ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* được xem là vi khuẩn tương đối nhạy cảm với điều kiện nuôi cấy, nếu lượng vi khuẩn quá thấp có thể làm giảm tần số tiếp xúc với các mẫu thực vật, ngược lại nếu nồng độ quá cao có thể gây ảnh hưởng xấu tới sự phát triển của mẫu, thậm chí gây chết mẫu trong quá trình nuôi cấy [125]. Ismael và

Antar (2014), khi nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen vào giống đậu tương Giza 21 của Ai Cập thông qua *A. tumefaciens* cho thấy, số lượng mô sẹo biểu hiện gen *luc* tăng lên theo thời gian cấy và mật độ vi khuẩn (OD_{600}) và sau đó giảm đột ngột với sự gia tăng của cả hai yếu tố. Hiệu suất biến nạp cao nhất (90%) thu được khi cấy mẫu trong thời gian tối đa 40 phút ở OD_{600} là 1,0, tiếp theo là 87,5 và 82,5% ở OD_{600} là 0,8 và 1,2 tương ứng [83]. Hada và cs (2018), sau khi tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy với mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* là (OD_{600}) là 0,8, đồng nuôi cấy trong 3 ngày nhằm cải thiện khả năng biến nạp gen vào giống đậu tương DS-9712 cho thấy hiệu quả biến nạp tối đa 14% và hiệu suất tái sinh là 45% [70].

Trong kết quả nghiên cứu của luận án, các mảnh lá mầm đậu tương đã được làm tổn thương tại nách lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} khác nhau, dịch khuẩn có giá trị $OD_{650} = 0,6$ với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối là thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố của Li và cs (2017), khi nghiên cứu tối ưu quy trình chuyển gen ở đậu tương qua vi khuẩn *Agrobacterium* bằng cách cải thiện hiệu quả lây nhiễm của vi khuẩn và tái sinh của mẫu cấy; với hiệu quả lây nhiễm tốt nhất (>96%) khi nồng độ đạt $OD_{650} = 0,6$ và đồng nuôi cấy trong 5 ngày [95]. Ngoài ra, việc xác định kháng sinh và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy là yếu tố quan trọng đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau khi được lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Kết quả qua từng giai đoạn cho thấy, nồng độ cefotaxime 500 mg/l được bổ sung vào môi trường diệt khuẩn rửa trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất để sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22.

Như vậy, từ kết quả đánh giá các tác động của các yếu tố lên khả năng biến nạp và tạo đa chồi ở giống đậu tương ĐT22, luận án đã được xác định các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* và tạo đa chồi ở giống đậu tương ĐT22. Nồng độ PPT 3,0 mg/l sử dụng chọn lọc ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi và PPT 1,5 mg/l ở giai

đoạn kéo dài chồi cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ bằng 0,6 với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc. Kết quả này là tiền đề để hoàn thiện quy trình chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo (Phụ lục 2).

3.3. BIẾN NẠP GEN *codA* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22 VÀ TẠO CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN CHỊU HẠN

3.3.1. Kết quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22

Chủng *A. tumefaciens* C58 mang các plasmid tái tổ hợp *pIBTII-rd29A-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-HSP-codA* được sử dụng để chuyển gen vào đậu tương thông qua nách lá mầm hạt giống đậu tương ĐT22 sau 5- 7 ngày gieo theo phương pháp Olhof và cs (2001) [115]. Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá mầm đậu tương được trình bày trong bảng 3.6, các giai đoạn phát triển cụ thể của quá trình chuyển gen ở đậu tương được thể hiện trong hình 3.11.

Bảng 3.6. Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá mầm đậu tương

Cấu trúc	Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo đa chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi tạo rễ	Số cây sống trên giá thể
<i>HSP-codA</i>	3001	1935	128	61	18
<i>35S-codA</i>	3012	1890	238	104	19
<i>rd29A-codA</i>	3025	2225	140	69	23
Tổng	9038	6050	506	234	60

Bảng 3.6 cho thấy, số lượng mẫu biến nạp cho mỗi cấu trúc khoảng 3000 mẫu, trong đó số mẫu tạo đa chồi dao động từ 1890- 2225 mẫu, tương đương tỉ lệ từ 62,75% đến 73,55%. Từ các cụm chồi này, sau 3 giai đoạn kéo dài chồi thu được lần lượt 128, 238, 140 chồi kéo dài tương ứng lần lượt với cấu trúc *HSP-codA*, *35S-*

codA, và *rd29A-codA*. Các chồi đạt chiều cao 2,5– 3,5 cm và có các lá chính được chuyển sang môi trường tạo rễ. Các chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh được trồng trên giá thể TN1 bổ sung 25% tribat. Sau quá trình thích nghi sinh trưởng trong buồng sinh trưởng nhiệt độ 28°C, độ ẩm 80%, quang chu kỳ sáng/tối là 16/8, thu được tổng số 60 cây đậu tương của ba cấu trúc chuyển gen sinh trưởng và phát triển tốt.



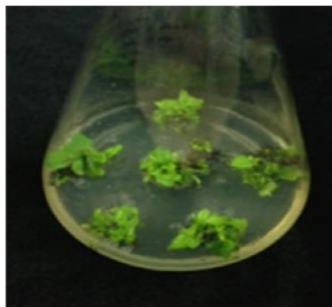
Hạt đậu tương ĐT22



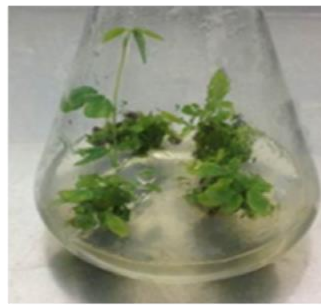
**Mảnh lá mầm sau 5 ngày
đồng nuôi cấy**



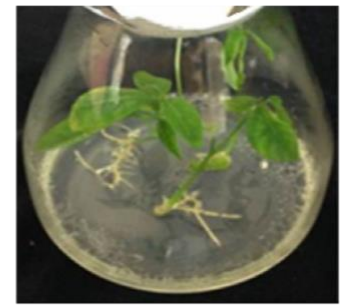
**Mảnh lá mầm trên môi trường
SIM có bổ sung ppt 3 mg/l**



**Cụm đa chồi trên môi trường
SEM có bổ sung ppt 1,5 mg/l**



**Chồi kéo dài trên môi trường
SEM có bổ sung ppt 1,5 mg/l**



**Chồi tạo rễ
trên môi trường RM**



Cây T₀



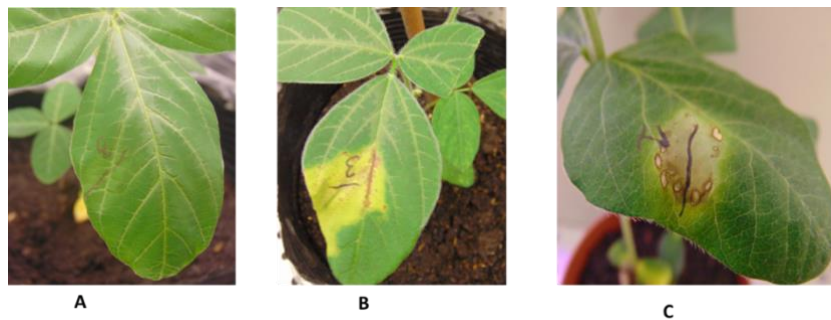
Cây T₁

Hình 3.11. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp và tạo cây đậu tương chuyển gen

3.3.2. Phân tích cây đậu tương chuyển gen

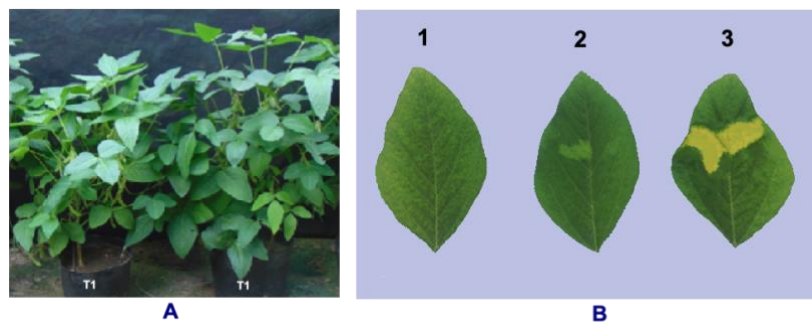
3.3.2.1. Sàng lọc cây chuyển gen bằng chất diệt cỏ và PCR

Các cây đậu tương chuyển gen trong nhà lưới được sàng lọc bằng chất diệt cỏ và tiến hành lấy mẫu phân tích PCR để xác định sự có mặt của gen chuyển *codA* trong hệ gen cây đậu tương.



Hình 3.12. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T_0 bằng PPT

A) Cây T_0 dương tính với PPT 250mg/l. B) Cây T_0 âm tính với PPT 250mg/l.
C) Cây đối chứng



Hình 3.13. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T_1 bằng PPT

A: Cây T_1 ở thời điểm sau 20 ngày gieo hạt

B1: Lá cây T_1 dương tính với PPT 250mg/l

B2: Lá cây T_1 có khả năng tự phục hồi với PPT 250mg/l

B3: Lá cây T_1 âm tính với PPT 250mg/l.

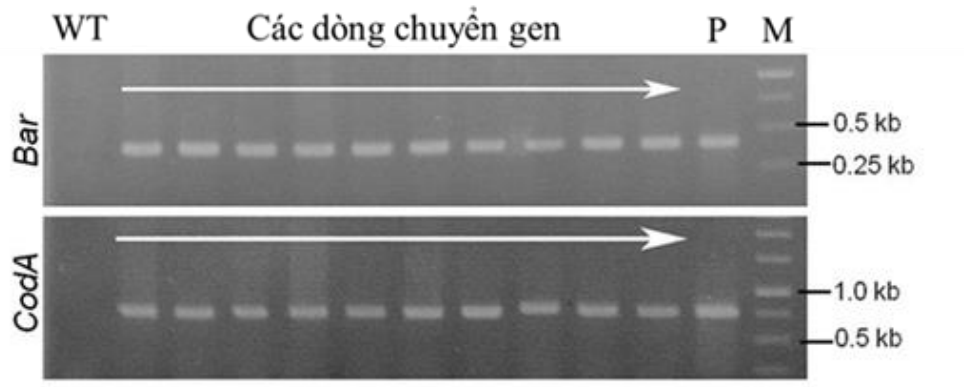
Các dòng đậu tương chuyển gen T_0 , T_1 được phết trực tiếp PPT 250mg/l lên bề mặt lá. Sau 3 ngày phết chất diệt cỏ, phần lá tại vị trí phết của cây đối chứng và một số dòng chuyển gen co lại, mất dần sắc tố xanh lục của lá và chuyển vàng; sau 5 ngày phết, vị trí lá thử chất diệt cỏ chuyển sang vàng nâu, cháy khô (Hình 3.12 và 3.13). Bên cạnh đó, một số dòng chuyển gen không xuất hiện dấu hiệu gây hại của chất diệt cỏ tại vị trí thử, lá không bị mất màu màu sắc.

Kết quả sau khi sàng lọc bằng chất diệt cỏ thu được các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_0 , T_1 không mẫn cảm với PPT 250mg/l thể hiện ở bảng 3.7 và phụ lục 3. Các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_0 và T_1 của các cấu trúc không mẫn cảm với PPT sẽ được thu lá và tiến hành kiểm tra bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Bảng 3.7. Kết quả biến nạp các cấu trúc chuyển gen *codA*

Tên cấu trúc	Thế hệ T_0				Thế hệ T_1	
	Số dòng chuyển gen	Số dòng dương tính sau khi thử PPT	Số dòng dương tính sau khi PCR	Hiệu suất chuyển gen (%)	Số dòng dương tính sau khi thử PPT	Số dòng dương tính sau khi PCR
<i>HSP-codA</i>	18	10	8	0,267	2	2
<i>35S-codA</i>	19	9	10	0,333	0	0
<i>rd29A-codA</i>	23	10	9	0,297	6	4
Tổng	60	29	27		8	6

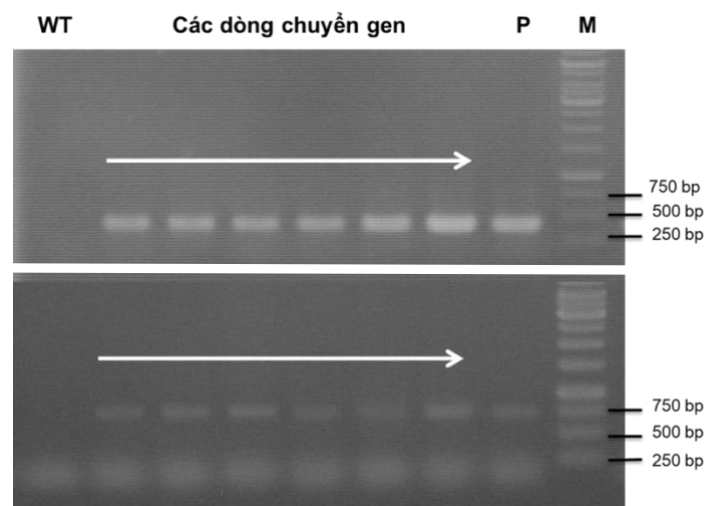
Bảng 3.7 cho thấy, từ 60 dòng T_0 thu được đem sàng lọc bằng PPT 250mg/l thu được 29 dòng không mẫn cảm. Các dòng này được kiểm tra bằng phản ứng PCR với 2 cặp mồi *codA* F/R và *Bar* F/R. Kết quả PCR thu được 27 dòng cho kết quả dương tính trong đó có 8 dòng *HSP-codA*, 10 dòng *35S-codA* và 9 dòng *rd29A-codA* (hình 3.14).



Hình 3.14. Kết quả kiểm tra cây T₀ bằng PCR

M: thang DNA chuẩn 1kb; P: dòng khuẩn A. tumefaciens mang vector tái tổ hợp;

WT: mẫu lá đậu tương DT22



Hình 3.15. Kết quả kiểm tra cây T₁ bằng PCR

M: thang DNA chuẩn 1kb; P: dòng khuẩn A. tumefaciens mang vector tái tổ hợp;

WT: mẫu lá đậu tương DT22

Từ 27 dòng T₀ thu hạt đem gieo sang thế hệ T₁, tiến hành sàng lọc và kiểm tra bằng PPT 250mg/l, thu được 8 dòng không mẫn cảm PPT gồm có 6 dòng *rd29A-codA* và 2 dòng *HSP-codA*. 8 dòng này được PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu thu được 4 dòng *rd29A-codA* và 2 dòng *HSP-codA* nhận được 2 băng có kích thước khoảng

750bp và 400bp phù hợp với kích thước của đoạn gen *codA* và gen *bar* tương ứng được thể hiện trong hình 3.15.

Bảng 3.8. Các dòng đậu tương thế hệ T₁ có biểu hiện gen *codA* và có khả năng chống chịu hạn

TT	Tên dòng T ₁	Kí hiệu mẫu	Kết quả kiểm tra			Khả năng kháng chất diệt cỏ	Cách thức bảo quản hạt
			PCR	Southern blot	Western blot		
1	Rd29A-codA 2	D2	+	+	+	+	Bảo quản cùng silica gel
2	Rd29A-codA 3	D3	+	+	+	+	Bảo quản cùng silica gel
3	Rd29A-codA 4	D4	+	+	+	+	Bảo quản cùng silica gel
4	Rd29A-codA 7	D7	+	+	+	+	Bảo quản cùng silica gel
5	HSP-codA 3	H3	+			+	Bảo quản cùng silica gel
6	HSP-codA 11	H11	+			+	Bảo quản cùng silica gel

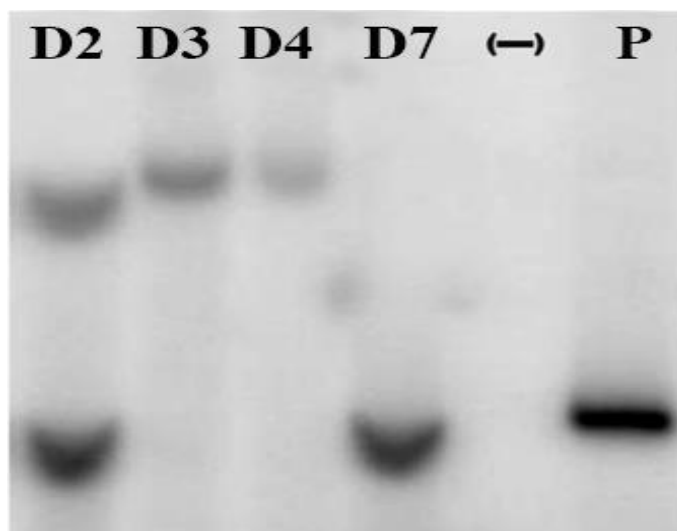
+: Kết quả dương tính.

Kết quả trên cho thấy, số lượng dòng cây chuyển gen giảm ở thế hệ T₁ do lượng hạt thu từ cây *in vitro* T₀ ít, chất lượng hạt không đồng đều ảnh hưởng đến sức nảy mầm của hạt ở thế hệ tiếp theo. Như vậy, nghiên cứu của luận án đã thu được 27 dòng đậu tương mang gen *codA* ở thế hệ T₀ và 6 dòng ở thế hệ T₁, hiệu suất chuyển gen đạt khoảng 0,3% ở thế hệ T₀. Để kiểm tra các dòng đậu tương chuyển gen ở các thế hệ tiếp theo, 4 dòng T₁ mang promoter cảm ứng chịu hạn

rd29A đã được sử dụng do sự biểu hiện hoạt động tích cực của promoter này, 2 dòng T_1 mang gen *codA* dưới sự hoạt động của promoter cảm ứng nhiệt *HSP* được thu hạt và bảo quản cùng silica gel (bảng 3.8).

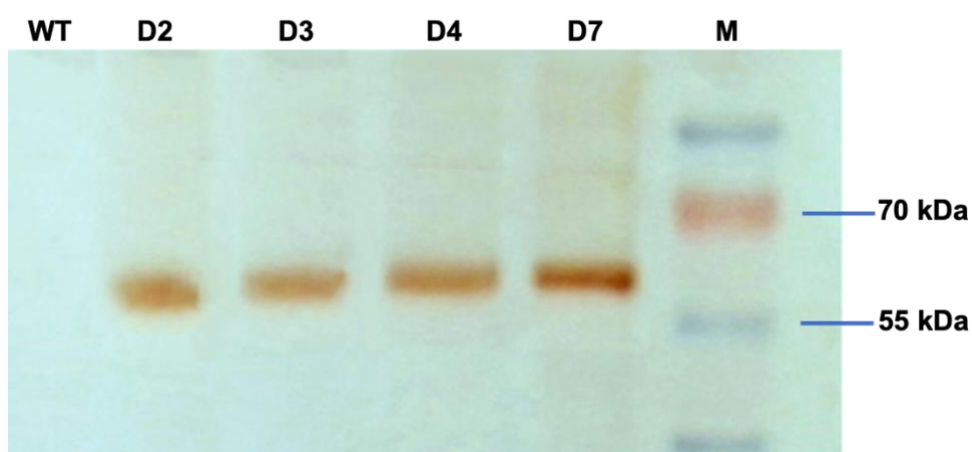
3.3.2.2. Kiểm tra sự hợp nhất và sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trong các dòng đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot và Western blot

Bốn dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* thế hệ T_1 (D2, D3, D4, D7) được kiểm tra bằng kỹ thuật Southern blot để chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển *codA* vào hệ gen cây đậu tương biếp nạp và xác định số bản copy của gen chuyển. Kết quả phân tích Southern blot trong hình 3.16 cho thấy, các băng lai DNA xuất hiện ở cả bốn dòng đậu tương chuyển gen được kiểm tra. Các dòng D3, D4 và D7 có một băng lai xuất hiện; còn dòng D2 xuất hiện 2 băng lai. Điều này chỉ ra rằng gen *codA* có 1 bản copy trong các dòng D3, D4 và D7, và có 2 bản copy trong dòng D2. Băng lai của hai dòng D3 và D4 cho thấy rất có thể hai dòng này được tạo ra từ cùng một mô chuyển gen. Kết quả phân tích này đã chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển *codA* vào hệ gen cây đậu tương chuyển gen.



Hình 3.16. Kết quả phân tích Southern blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1
D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc rd29A-codA thế hệ T_1 ;
(-): đối chứng âm; P: Plasmid pIBTII-35S-codA làm đối chứng dương

Tiếp tục phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trên 4 dòng chuyển gen D2, D3, D4, D7 thế hệ T_1 thông qua xác định sự có mặt của protein tái tổ hợp bằng Western blot. Protein tái tổ hợp của cấu trúc chuyển gen *codA* có chứa kháng nguyên cmyc ở đầu C, do đó protein tái tổ hợp này có thể được phát hiện bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển trong cây bằng kỹ thuật Western blot với mẫu lá non của các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* được thể hiện trên hình 3.17.



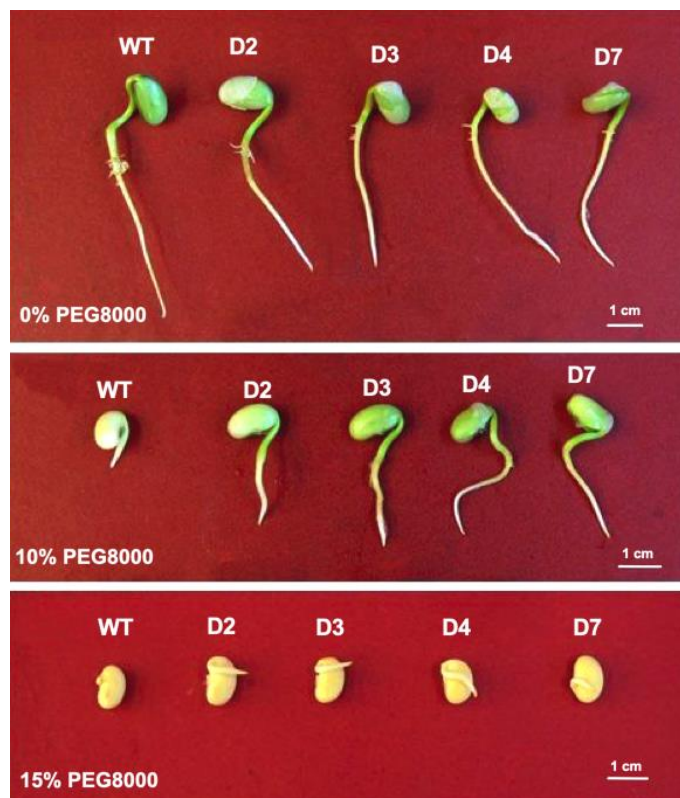
Hình 3.17. Kết quả phân tích Western blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1
D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc rd29A-codA thế hệ T_1 ;
M: Marker; WT: mẫu đậu tương không chuyển gen

Kết quả phân tích Western blot cho thấy, các băng protein có kích thước ~60 kDa tương đương với khối lượng phân tử choline oxidase được mã hóa bởi gen *codA* khi tra cứu trên ngân hàng NCBI. Trên hình 3.17, các cây chuyển gen đều cho băng vạch sáng rõ, trong khi cây WT không có băng vạch tương đương. Kết quả phân tích biểu hiện protein choline oxidase tái tổ hợp ở cây đậu tương chuyển gen *codA* đã chứng minh gen chuyển mang cấu trúc *rd29A-codA* đã di truyền từ thế hệ T_0 sang thế hệ T_1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp choline oxidase.

3.3.3. Thử nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen

3.3.3.1. Đánh giá sức nảy mầm của hạt dưới điều kiện hạn nhân tạo

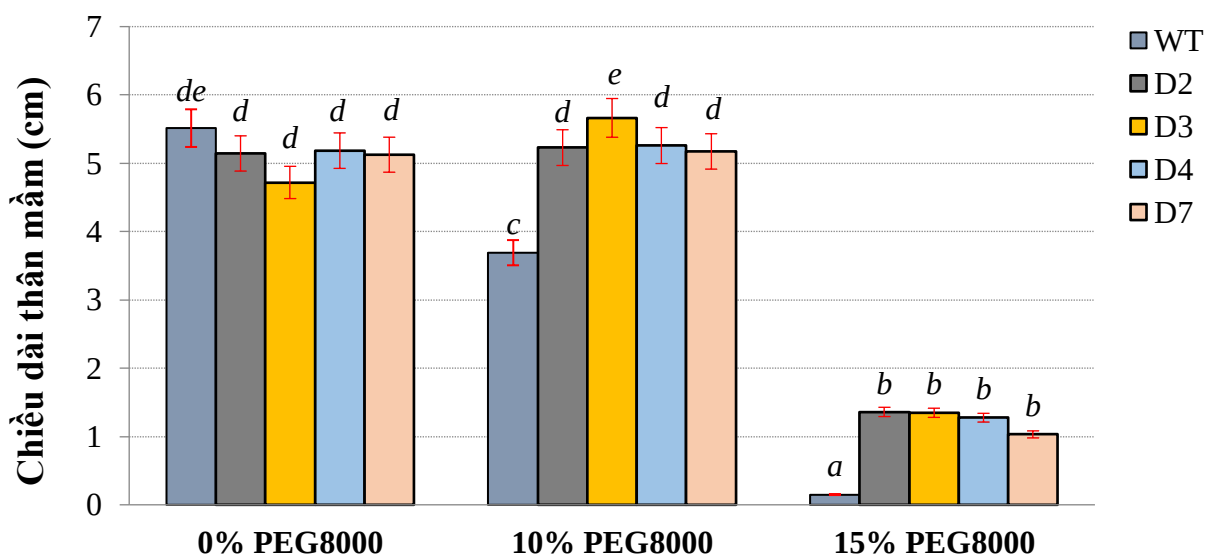
Giai đoạn hạt nảy mầm và thân mầm là các giai đoạn quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật đặc biệt nhạy cảm với các điều kiện thiếu nước. Vì thế, hạt của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T_1 đã được đánh giá trong điều kiện gây hạn nhân tạo bằng cách bổ sung 10% hoặc 15% PEG 8000 vào môi trường dinh dưỡng. Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường không bổ sung PEG 8000 (0% PEG 8000), không nhận thấy sự khác biệt trong chiều dài thân mầm giữa dòng DT22 và các dòng chuyển gen thể hiện trong hình 3.18.



Hình 3.18. Khả năng nảy mầm của đậu tương sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường hạn nhân tạo

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng đậu tương DT22 không chuyển gen

Kết quả đánh giá khả năng nảy mầm của các hạt đậu tương trên môi trường hạn nhân tạo trong hình 3.18 cho thấy, 100% các hạt của các dòng thí nghiệm đều nảy mầm tốt và có chiều dài thân mầm đạt xấp xỉ 5 cm ở môi trường GM không chứa PEG 8000. Ngược lại, trên môi trường nảy mầm có bổ sung 10% PEG8000, các hạt của dòng chuyển gen và ĐT22 đều nảy mầm, tuy nhiên chiều dài của thân mầm của các dòng đậu tương là khác nhau. Dòng ĐT22 không chuyển gen biểu hiện giảm chiều dài thân mầm còn dưới 4 cm, ngắn hơn hẳn so với các dòng chuyển gen, trong khi hạt của các dòng chuyển gen vẫn duy trì sự sinh trưởng bình thường. Trên môi trường chứa 15% PEG 8000, khả năng nảy mầm và sinh trưởng của cả dòng ĐT22 và dòng chuyển gen đều giảm đi đáng kể. Khả năng sinh trưởng của hạt trên môi trường bị ức chế. Tuy nhiên, các hạt của dòng đậu tương chuyển gen vẫn có tỷ lệ sinh trưởng cao hơn và có chiều dài thân mầm lớn hơn hẳn so với dòng đậu tương ĐT22 không chuyển gen thể hiện trong đồ thị hình 3.19.



Hình 3.19. Chiều dài thân mầm của các dòng hạt đậu tương trên môi trường hạn nhân tạo

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng đậu tương ĐT22 không chuyển gen; (Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

Như vậy, nhờ biểu hiện của gen *codA*, hạt của các dòng đậu tương chuyển gen có khả năng nảy mầm và sinh trưởng tốt hơn so với dòng không chuyển gen (ĐT22) trong điều kiện hạn nhân tạo *in vitro*.

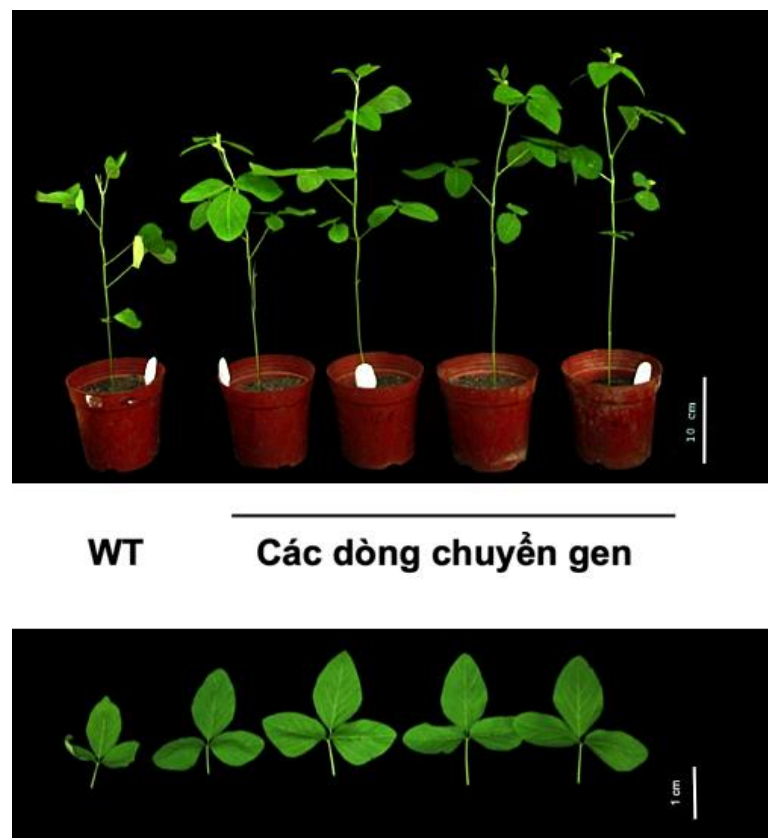
3.3.3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng và chịu hạn của cây đậu tương chuyển gen dưới điều kiện hạn nhân tạo

Để đánh giá sinh trưởng và phát triển của đậu tương trong môi trường hạn nhân tạo, hạt của các dòng đậu tương chuyển gen *codA* và đậu tương ĐT22 không chuyển gen được trồng riêng lẻ trong một chậu và được kiểm tra bằng phết chất diệt cỏ. Ở giai đoạn 2 của thí nghiệm, cây đậu tương được xử lý gây hạn nhân tạo trong buồng tăng trưởng. Trong suốt quá trình thí nghiệm, các cây đậu tương chuyển gen và ĐT22 được đặt trong điều kiện đối chứng đều sinh trưởng và phát triển bình thường ở điều kiện tưới đủ nước, không nhận thấy sự khác biệt về hình thái thực vật giữa các dòng.

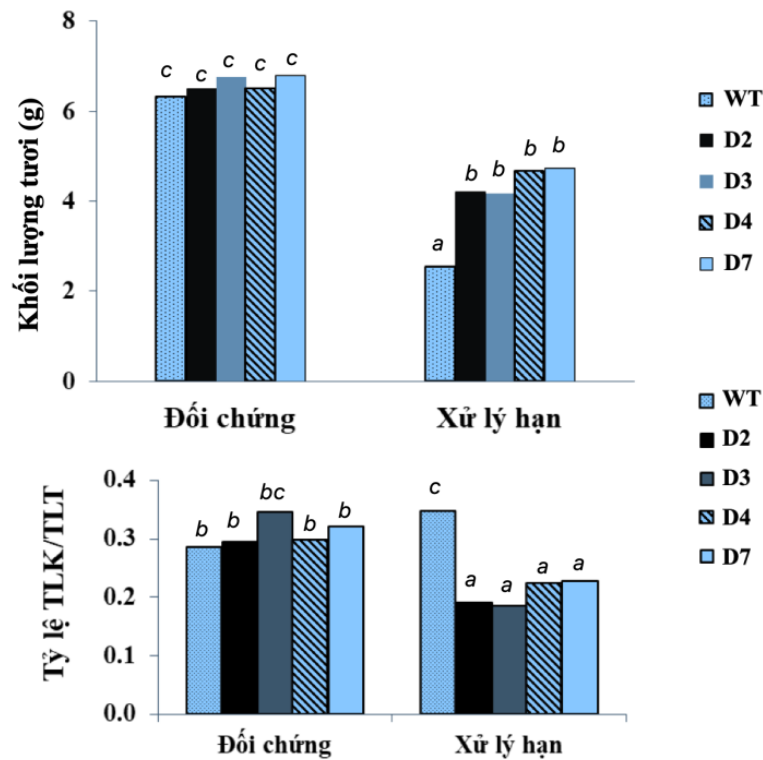
Ngược lại, trong điều kiện xử lý hạn nhân tạo, tốc độ sinh trưởng của dòng đậu tương ĐT22 có dấu hiệu chậm lại so với các dòng đậu tương chuyển gen. Hơn nữa, đến ngày thí nghiệm thứ 9, trong điều kiện hạn, các lá của dòng đậu tương ĐT22 cho thấy sinh trưởng có dấu hiệu bị úa vàng, khô lại và héo rụng. Trong khi đó, các lá đậu tương của các dòng chuyển gen mặc dù cũng có dấu hiệu suy giảm sinh trưởng như héo, nhưng vẫn có thể phục hồi sau khi được tưới nước trở lại (Hình 3.20). Khối lượng tươi trung bình của các dòng đậu tương thí nghiệm cũng được xác định nhằm đánh giá tốc độ tăng trưởng của các cây đậu tương chuyển gen trong điều kiện hạn nhân tạo. Sinh khối thu được vào ngày thứ 9 của các dòng đậu tương trong thí nghiệm chịu hạn nhân tạo được thể hiện trong hình 3.21.

Kết quả phân tích biểu đồ cho thấy, trong điều kiện đối chứng, sinh khối đạt được của các dòng đậu tương (bao gồm dòng ĐT22 và các dòng chuyển gen) tương đương nhau, điều này cũng trùng khớp với kết quả đánh giá sinh trưởng của cây thông qua quan sát bên ngoài. Ngược lại, có sự chênh lệch đáng kể trong sinh khối

thu được giữa các dòng chuyển gen và dòng ĐT22 dưới điều kiện hạn. Cụ thể, đối với dòng ĐT22, sinh khối thu được trong điều kiện hạn giảm chỉ còn một nửa (đạt 2,56 g) so với sinh khối thu được trong điều kiện đối chứng (đạt 6,32 g). Khối lượng tươi và tỷ lệ khối lượng khô/khối lượng tươi (KLK/KLT) của các dòng đậu tương thí nghiệm vào ngày thí nghiệm thứ 9 trong cả hai điều kiện đối chứng và xử lý hạn cho thấy, các dòng đậu tương chuyển gen cũng có sự giảm sinh khối trong điều kiện hạn so với trong điều kiện đối chứng, tuy nhiên lại cao hơn đáng kể so với sinh khối của dòng ĐT22. Như vậy, các dòng đậu tương chuyển gen *codA* đã duy trì được tốc độ tăng trưởng và sinh khối cao hơn hơn cây đậu tương không chuyển gen trong điều kiện gây hạn nhân tạo.



Hình 3.20. Kiểu hình của các dòng đậu tương vào ngày thí nghiệm thứ 9 trong điều kiện hạn nhân tạo

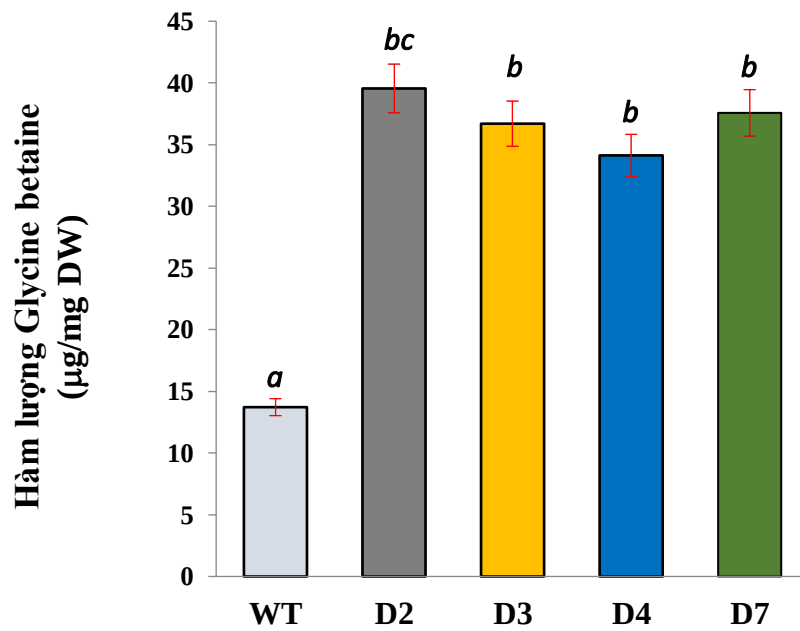


Hình 3.21. Sinh khối thu được vào ngày thứ 9 của các dòng đậu tương trong thí nghiệm chịu hạn nhân tạo

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng DT22 không chuyển gen; (Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

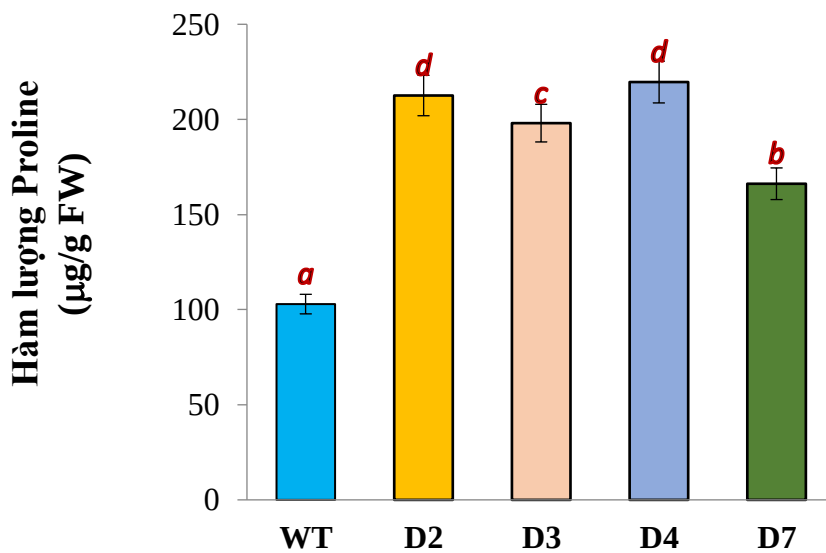
3.3.3.3. Đánh giá các chỉ số hóa sinh của cây đậu tương chuyển gen dưới điều kiện hạn nhân tạo

Lá của các cây của 4 dòng đậu tương chuyển gen D2, D3, D4, D7 trong thí nghiệm chịu hạn và không chịu hạn được thu mẫu để phân tích các chỉ số hoá sinh bao gồm, chỉ số GB theo phương pháp của Grieve và Grattan (1983) [66]; chỉ số MDA, proline và hoạt độ POD theo phương pháp của Chen và Zhang (2016) [35]. Kết quả thu được từ các chỉ số hóa sinh cho thấy, có sự tích lũy đáng kể các hợp chất có vai trò bảo vệ tế bào trong trạng thái mất nước như GB, proline. Hàm lượng GB và proline tăng cao ở các dòng đậu tương chuyển gen *codA*.



Hình 3.22. Hàm lượng GB của các dòng đậu tương chịu hạn

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng không chuyển gen
(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

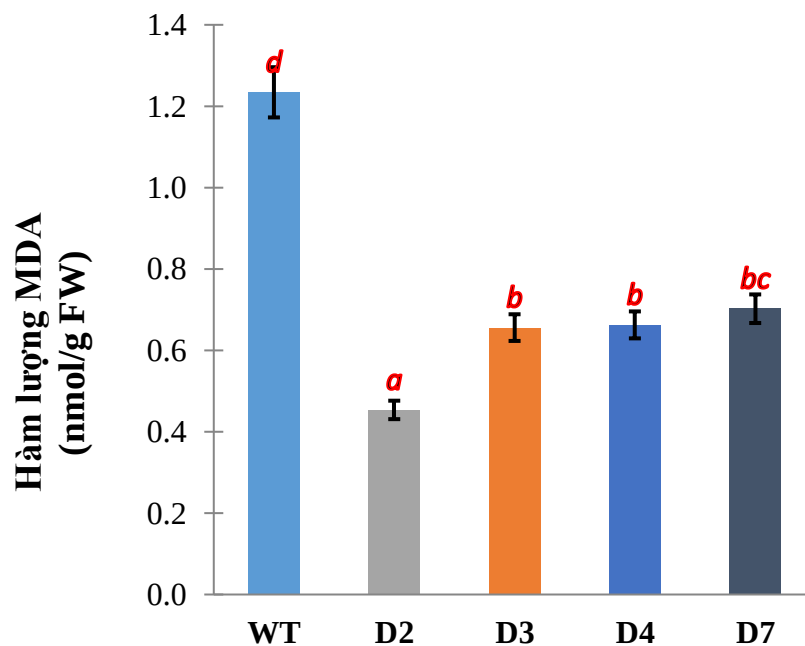


Hình 3.23. Hàm lượng proline của các dòng đậu tương chịu hạn

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng không chuyển gen.
(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

Kết quả phân tích hình 3.22 cho thấy, trong tất cả các lá đậu tương chuyển gen, hàm lượng GB đều cao hơn so với ở lá cây ĐT22 không chuyển gen. Cụ thể, hàm lượng GB dao động trong khoảng từ 34,1 đến 39,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ khối lượng khô (DW). Dòng đậu tương D2 có hàm lượng GB 39,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW tích lũy cao nhất và thấp nhất là dòng D4 là 34,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, trong khi đó trong lá dòng đậu tương không chuyển gen ĐT22 hàm lượng GB chỉ đạt 13,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW.

Hàm lượng proline của dòng không chuyển gen ĐT22 chỉ đạt 102,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ khối lượng tươi (FW), trong khi đó lại tăng cao ở cả 4 các dòng đậu tương chuyển gen và tăng tới 219,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ FW ở dòng D4 (hình 3.23). Sự tăng cường tích lũy lượng GB và proline đã cho thấy sự biểu hiện tốt của gen chuyển *codA* trong cây đậu tương chuyển gen trong điều kiện thiếu nước, từ đó nâng cao khả năng chống chịu hạn của đậu tương.

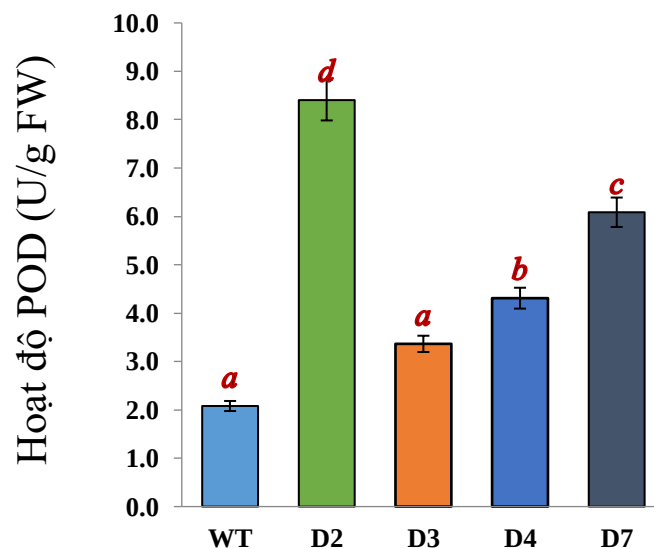


Hình 3.24. Hàm lượng MDA của các dòng đậu tương chịu hạn

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng không chuyển gen.

(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

Chỉ số đánh giá mức độ tổn thương của màng tế bào, MDA, sản phẩm từ quá trình oxy hóa các acid béo không bão hòa trên màng tế bào, và hoạt độ của POD, enzyme tham gia quá trình chống lại sự oxy hóa của tế bào, cũng được xác định. Để kiểm tra sự phá hủy oxy hóa trên màng sự ổn định của các dòng đậu tương, hàm lượng MDA của lá đậu tương sau khi bị stress hạn đã được xác định (Hình 3.24). Kết quả phân tích hình 3.24 cho thấy, trong tất cả các dòng đậu tương chuyển gen *codA*, hàm lượng MDA thấp hơn rõ ràng so với dòng cây đối chứng. Trong điều kiện khô hạn, hàm lượng MDA của lá kiểu đại cao, ở mức là 1,234 nmol/g FW, trong khi hàm lượng MDA trong đậu tương chuyển gen giảm từ 0,702 xuống 0,454 nmol/g FW. Những kết quả này chỉ ra rằng cây đậu tương chuyển gen *codA* biểu hiện oxy hóa ít nghiêm trọng hơn và tổn thương ít hơn so với cây không chuyển gen.



Hình 3.25. Hoạt độ POD của các dòng đậu tương chịu hạn

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng không chuyển gen.

(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$)

Hoạt động của POD cũng được biết đến như một chỉ báo về khả năng chống chịu của các giống đậu tương chống lại sự thiếu nước. Do đó, luận án đã xác định

hoạt động của POD trong lá đậu tương sau khi bị stress hạn (Hình 3.25). Phân tích hoạt độ của POD trong hình 3.25 cho thấy trong tất cả các dòng đậu tương chuyển gen là cao hơn hẳn so với dòng đậu tương không chuyển gen ĐT22 chỉ đạt 2,08 U/g FW, trong đó dòng đậu tương chuyển gen D₂ cho thấy hoạt độ của POD cao nhất (đạt 8,4 U/g FW). Kết quả này rất phù hợp với dữ liệu MDA trong hình 3.24, trong đó hàm lượng MDA thấp nhất được quan sát thấy ở dòng chuyển gen D₂ (0,45 nmol/g FW). Sự tăng hoạt động của POD và giảm hàm lượng MDA trong cây đậu tương chuyển gen so với cây không chuyển gen có liên quan đến sự tăng khả năng chống chịu của cây đậu tương chuyển gen trong điều kiện hạn. Trong nghiên cứu chuyển gen *codA* trên đối tượng đậu tương, sự tăng hoạt động của POD lên gấp 4 lần và hàm lượng MDA giảm 50% so với cây không chuyển gen đã được ghi nhận. Như vậy, sự hoạt động của gen *codA* dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng chịu hạn đã làm tăng khả năng chống chịu của đậu tương.

3.3.4. Thảo luận kết quả biến nạp gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 và thử nghiệm khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen

Trong nghiên cứu này, gen *codA* từ vi khuẩn *A. globiformis* dưới sự điều khiển của promoter *rd29A*, *HSP* và *35S* đã được biến nạp thành công vào cây đậu tương. Các kết quả phân tích cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và Southern blot đã xác nhận sự hiện diện của *codA* trong cây đậu tương chuyển gen. Cây đậu tương chuyển gen cho thấy tốc độ tăng trưởng nhanh hơn, sản xuất sinh khối lớn hơn so với dòng đậu tương đối chứng không chuyển gen ở môi trường gây hạn nhân tạo. Ngoài ra, sự tích lũy hàm lượng GB, proline và hoạt độ của POD cũng cho thấy sự tăng cao trong cây đậu tương chuyển gen dưới sự biểu hiện gen *codA* trong cây đậu tương chuyển gen. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu được công bố gần đây về sự tăng cường biểu hiện gen *codA* thông qua sự tích lũy hàm lượng GB, proline và hoạt độ của POD ở một số loài thực vật chuyển gen [13], [38], [118].

So với các gen tham gia sinh tổng hợp GB ở các đối tượng sinh vật khác, gen *codA* mã hoá choline oxidase có thể chuyển hoá tiền chất choline thành GB qua

một bước duy nhất mà không cần bất cứ chất xúc tác nào khác. Vì vậy, gen *codA* thường được sử dụng để biến nạp vào các loài thực vật quan trọng về mặt kinh tế nhằm nâng cao khả năng chống stress thẩm thấu [133]. Cây chuyển gen của một số các loài biểu hiện gen *codA* cho thấy sự cải thiện khả năng chịu đựng các stress phi sinh học khác nhau. Cây *Arabidopsis* chuyển gen *codA* cho thấy sự tích lũy GB trong lục lạp và khả năng chịu băng giá đáng kể [133]. Sự tích lũy GB tăng lên trong quá trình chuyển gen cây cà chua được bảo vệ cơ quan sinh sản dưới stress lạnh [118]. Theo nghiên cứu của luận án, hàm lượng GB tích lũy trong cây đậu tương chuyển gen *codA* cao hơn ở dòng cây đậu tương không biến đổi gen khi gặp stress hạn. Hàm lượng GB được tích lũy ở mức độ cao hơn có thể tăng cường áp suất thẩm thấu, giảm sự mất nước do stress hạn của đậu tương chuyển gen và qua đó, duy trì tốc độ phát triển sinh dưỡng và sản xuất sinh khối cao hơn so với cây đậu tương không chuyển gen. Cây khoai tây chuyển gen *codA* cũng có các phản ứng tương tự trong điều kiện khô hạn [13]. Khả năng chịu mặn cũng được cải thiện ở khoai tây và cỏ linh lăng chuyển gen do sự biểu hiện quá mức của gen chuyển *codA* dưới sự kiểm soát của promoter cảm ứng hạn *rd29A* hoặc promoter *SWPA2* tương ứng [13], [94]. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn cần được tiến hành để đánh giá các cây đậu tương chuyển gen trong các điều kiện stress.

Ngoài GB, proline tự do cũng được tích lũy trong thực vật dưới áp lực môi trường. Sự biểu hiện quá mức của các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật chuyển gen biểu hiện ở hàm lượng proline tự do cao hơn giúp tăng cường khả năng chống chịu với stress hạn [178]. Theo nghiên cứu của Fan và cs (2016), hàm lượng proline và hàm lượng GB trong cây chuyển gen có mối liên hệ với nhau, tuy nhiên, các cơ chế phân tử GB trong thực vật và cách GB được kết hợp hoặc tương tác với chức năng proline trong thực vật vẫn còn cần được làm sáng tỏ [53]. Sự gia tăng hàm lượng proline cũng được tìm thấy trong cây cỏ linh lăng chuyển gen *codA* trong điều kiện thiếu nước [94]. Kết quả nghiên cứu này về cây đậu tương chuyển gen *codA* cho thấy, hàm lượng proline tự do tăng lên cũng như có sự gia tăng đáng kể hàm lượng GB tích lũy trong điều kiện thiếu nước. Sau 9

ngày xử lý hạn, hàm lượng proline trong cây đậu tương chuyển gen *codA* đã tăng gấp 1,5- 2 lần so với cây đậu tương DT22 không chuyển gen. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Li và cs (2014) và Zheng và cs (2017) về lượng proline tăng lên gấp 2 lần ở cỏ linh lăng chuyển gen *codA* hoặc *EDT1* trong điều kiện khô hạn [94], [178]. Tuy nhiên, ở cây đậu tương chuyển gen *BADH*, hàm lượng proline tăng ít hơn 20% [127]. Như vậy, nghiên cứu của luận án góp phần khẳng định tầm quan trọng của gen *codA* trong khả năng chống chịu hạn của đậu tương.

Hàm lượng MDA, một acid béo không bão hòa sản xuất peroxy hóa tăng lên được coi là một chỉ số của tổn thương màng tế bào [73]. Ngoài hàm lượng MDA, hoạt độ của POD cũng là chỉ số quan trọng trong việc đánh giá khả năng chống chịu của các kiểu gen đậu tương ở điều kiện thiếu nước. Sự gia tăng hoạt độ POD có liên quan đến khả năng chịu hạn cao hơn của các giống đậu tương chuyển gen [179]. Trong nghiên cứu này, cây đậu tương chuyển gen *codA* có hàm lượng MDA thấp hơn và hoạt độ của POD cao hơn đáng kể so với cây đậu tương không chuyển gen trong điều kiện khô hạn. Điều này cho thấy, khả năng làm giảm oxy hóa và hạn chế các tác động làm hỏng màng tế bào của cây đậu tương chuyển gen *codA*. Trong cây đậu tương chuyển gen *BADH*, hàm lượng MDA giảm hơn 13% so với cây đậu tương WT không chuyển gen trong điều kiện khô hạn; ngược lại, hoạt độ của POD cũng tăng lên đến 7% [127]. Theo kết quả nghiên cứu của luận án, hoạt độ của POD trong cây chuyển gen tăng lên gấp 4 lần so với đậu tương DT22 không chuyển gen, trong khi hàm lượng MDA giảm xuống một nửa. Những thay đổi lớn về hàm lượng MDA và POD có thể là do vai trò của gen chuyển *codA* và promoter *rd29A* trong cây đậu tương chuyển gen.

Cấu trúc mang gen chuyển *codA* đã được biến nạp thành công vào cây đậu tương thông qua *Agrobacterium*. Cây đậu tương chuyển gen *codA* có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn và sản xuất sinh khối cải thiện hơn so với cây đậu tương không biến nạp trong điều kiện khô hạn. Khả năng chịu stress hạn của cây đậu tương chuyển gen *codA* là kết quả của sự gia tăng hàm lượng GB cũng như hàm lượng proline trong cây đậu tương chuyển gen.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Ba vector chuyển gen *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA*, và *pIBTII-HSP-codA* mang gen *codA* mã hóa choline oxidase, dưới sự điều khiển lần lượt bởi 3 promoter cảm ứng khác nhau: *35S*, *rd29A* và *HSP* đã được thiết kế và biến nạp thành công vào cây thuốc lá. Trong điều kiện bất lợi về nhiệt độ, độ ẩm và nước, các dòng thuốc lá chuyển gen đã sống sót và phát triển bằng cách tích lũy hàm lượng glycine betain cao hơn so với cây thuốc lá không chuyển gen.
2. Các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* trong cấu trúc *pIBTII-rd29A-codA* vào giống đậu tương ĐT22 đã được xác định. Nồng độ PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Dịch *A. tumefaciens* có giá trị OD₆₅₀ = 0,6 với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.
3. Cấu trúc *pIBTII-rd29A-codA* được biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT22 và tạo được 4 dòng đậu tương chuyển gen *codA* ở thế hệ T₁. Các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T₁ được kiểm tra bằng Southern blot, Western blot và được đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện stress. Sự biểu hiện của gen chuyển *codA* dưới sự điều khiển của promoter *rd29A* làm tăng hoạt động phiên mã của gen *codA* và tăng sinh khối trong cây chuyển gen. Hàm lượng GB tăng cao ở các dòng đậu tương chuyển gen *codA*, dao động từ 34,1 đến 39,5 µg/mg khối lượng khô, tăng 248,9%- 288,3% so với cây không chuyển gen. Hàm lượng proline tăng 1,5- 2 lần, hoạt động của POD tăng lên gấp 4 lần so với cây không chuyển gen và hàm lượng MDA giảm 0,5 lần trong điều kiện khô hạn.

KIẾN NGHỊ

Các dòng đậu tương chuyển gen cần được tiếp tục theo dõi, đánh giá tính ổn định của gen chuyển qua các thế hệ và ứng dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dong Thi Ta⁺, Dung Manh Ngo⁺, Nhung Hong Nguyen, Ngoc Bich Pham, Phat Tien Do, Ha Hoang Chu (2020), “Production of drought tolerant transgenic soybean expressing *codA* gene under regulation of a water stress inducible promoter”, *Pakistan Journal of Botany*, 52(3), pp. 793-799, (SCIE). (+: *These authors contributed equality to this work*)
2. Ngô Mạnh Dũng, Tạ Thị Đông, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2020), “Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 225(11), pp. 121 – 127.
3. Ngô Mạnh Dũng, Tạ Thị Đông, Nguyễn Hồng Nhung, Nguyễn Văn Đoài, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2021), "Cấu trúc và hoạt động của vector chuyển gen thực vật mang gen mã hoá choline oxydase", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ ĐHTN*, 226(14), tr 297 - 304.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Bành Thị Mai Anh, Lê Thu Ngọc, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2014), "Phân lập gen nhân tố phiên mã *DREB3* của đậu tương và đánh giá hoạt động của cấu trúc *rd29a::DREB3* trên cây thuốc lá chuyển gen", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 12(2), pp. 261-267.
2. Nguyễn Đăng Minh Chánh, Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Trang, Phạm Thị Xuân, Truyền N.N. (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*. 1, pp. 60-66.
3. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào (1999), *Cây đậu tương*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
4. Trần Văn Điền (2007), *Giáo Trình Cây Đậu Tương*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
5. Chu Hoàng Hà, Bùi Văn Thắng (2017), "Khả năng chịu mặn của cây Xoan ta chuyển gen *codA* mã hóa colin oxydaza sinh tổng hợp glyxin-betain", *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT*, pp. 163-168.
6. Lê Thị Thu Hiền, Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải (2007), "Tổng quan về promoter và ứng dụng trong công nghệ gen thực vật", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 5(1), pp. 1-18.
7. La Việt Hồng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015), "Nhân dòng Promoter và Terminator Heat Shock Protein 18.2 từ *Arabidopsis thaliana* làm nguyên liệu thiết kế vector biểu hiện gen ở thực vật", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 31, pp. 28-35.
8. Nguyễn Thị Ngọc Lan, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu (2020), *Sinh học hiện đại một số vấn đề về nguyên lý và ứng dụng*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội.

9. Bùi Văn Thắng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2013), "Chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase vào cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) tăng cường khả năng chịu hạn", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Lâm nghiệp*. 2, pp. 3-10.
10. Lê Thị Hồng Trang, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Hữu Quân (2019), "Chuyển gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: một mô hình cho tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* ở cây đậu tương", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên*. 207(14), pp. 195-200.
11. Vaciauxa 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", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên*. 226, pp. 57 – 64.

Tiếng Anh

12. Abid G., M'hamdi M., Minget D., Aouida M., Aroua I., Muhovski Y., Sassi K., Souissi F., Mannai K., Jebara M. (2017), "Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in faba bean (*Vicia faba* L.)", *Archives of Agronomy and Soil Science*. 63(4), pp. 536-552.
13. Ahmad R., Kim M.D., Back K.-H., Kim H.-S., Lee H.-S., Kwon S.-Y., Murata N., Chung W.-I., Kwak S.-S. (2008), "Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses", *Plant cell reports*. 27(4), pp. 687-698.
14. Ahmed F., Rafii M., Ismail M.R., Juraimi A.S., Rahim H., Asfaliza R., Latif M.A. (2013), "Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects", *BioMed Research International*. 2013, pp. 1-10.

15. Alia, Hayashi H., Sakamoto A., Murata N. (1998), "Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycine betaine", *The Plant Journal*. 16(2), pp. 155-161.
16. Alia, Kondo Y., Sakamoto A., Nonaka H., Hayashi H., Saradhi P.P., Chen T.H., Murata N. (1999), "Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase", *Plant molecular biology*. 40(2), pp. 279-288.
17. Alloatti J., Blackford C., Burachik M., Chiozza M., Dezar C., Dicely I., Facciotti D., Gadisman M., Lu Z., Marchionni E. (2017), "Petition for determination of non-regulated status for the new plant variety HB4 soybean (IND-00410-5) intended for environmental release and food and feed use", *USDA (Application 17-223-01p)*.
18. Annunziata M.G., Ciarmiello L.F., Woodrow P., Dell'Aversana E., Carillo P. (2019), "Spatial and Temporal Profile of Glycine Betaine Accumulation in Plants Under Abiotic Stresses", *Frontiers in Plant Science*. 10(230), pp. 1-13.
19. Ashraf M., Foolad M.R. (2007), "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance", *Environmental and experimental botany*. 59(2), pp. 206-216.
20. Awari V., Mate S. (2015), "Effect of drought stress on early seedling growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes", *Life Sciences International Research Journal*. 2, pp. 356-361.
21. Baloda A., Madanpotra S. (2017), "Transformation of mungbean plants for salt and drought tolerance by introducing a gene for an osmoprotectant glycine betaine", *Journal of Plant Stress Physiology*. 3, pp. 5-11.
22. Bangar P., Chaudhury A., Tiwari B., Kumar S., Kumari R., Bhat K.V. (2019), "Morphophysiological and biochemical response of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] varieties at different developmental stages

- under drought stress", *Turkish Journal of Biology*. 43(1), pp. 58-69.
23. Bao Y., Aggarwal P., Robbins N.E., Sturrock C.J., Thompson M.C., Tan H.Q., Tham C., Duan L., Rodriguez P.L., Vernoux T. (2014), "Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(25), pp. 9319-9324.
 24. Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. (2016), "Plant adaptation to drought stress", *F1000Research*. 5(1554), pp. 1-10.
 25. Bengough A.G., McKenzie B., Hallett P., Valentine T. (2011), "Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits", *Journal of experimental botany*. 62(1), pp. 59-68.
 26. Bhargavi B., Kalpana K., Reddy J.K. (2017), "Influence of Water Stress on Morphological and Physiological Changes in *Andrographis paniculata*", *International journal of pure and applied bioscience*. 5, pp. 1550-1556.
 27. Bhauso T.D., Radhakrishnan T., Kumar A., Mishra G.P., Dobarra J.R., Patel K., Rajam M.V. (2019), "Overexpression of bacterial *mtlD* gene in peanut improves drought tolerance through accumulation of mannitol", *The Scientific World Journal*. 2014, pp. 1-10.
 28. Bremer E., Krämer R. (2019), "Responses of microorganisms to osmotic stress", *Annual review of microbiology*. 73, pp. 313-334.
 29. Brettschneider R., Becker D., Lörz H. (1997), "Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos", *Theoretical and Applied Genetics*. 94(6-7), pp. 737-748.
 30. Brito C., Dinis L.-T., Moutinho-Pereira J., Correia C.M. (2019), "Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate", *Plants*. 8(7), p. 232.
 31. Bucker-Neto L., Paiva A.L.S., Machado R.D., Arenhart R.A., Margis-

- Pinheiro M. (2017), "Interactions between plant hormones and heavy metals responses", *Genetics and molecular biology*. 40(1), pp. 373-386.
32. Cao Y., Luo Q., Tian Y., Meng F. (2017), "Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots", *BMC plant biology*. 17(1), pp. 1-16.
 33. Carillo P., Mastrolonardo G., Nacca F., Parisi D., Verlotta A., Fuggi A. (2008), "Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine", *Functional Plant Biology*. 35(5), pp. 412-426.
 34. Caverzan A., Casassola A., Brammer S.P. (2016), *Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress*, in Abiotic and biotic stress in plants-Recent advances and future perspectives., Shanher AK, Shanher C, Editors, Publisher InTech, pp. 463-480.
 35. Chen T., Zhang B. (2016), "Measurements of proline and malondialdehyde contents and antioxidant enzyme activities in leaves of drought stressed cotton", *Bio-protocol*. 6(17), p. e1913.
 36. Chen T.H., Murata N. (2002), "Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes", *Current opinion in plant biology*. 5(3), pp. 250-257.
 37. Chen T.H., Murata N. (2011), "Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications", *Plant, cell & environment*. 34(1), pp. 1-20.
 38. Cheng Y.J., Deng X.P., Kwak S.S., Chen W., Eneji A.E. (2013), "Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing choline oxidase in chloroplasts against water stress", *Botanical Studies*. 54(1), p. 30.
 39. Ciriello R., Guerrieri A. (2020), "Assay of phospholipase D activity by an amperometric choline oxidase biosensor", *Sensors*. 20(5), p. 1304.
 40. Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L. (1972), "Nonchromosomal antibiotic

- resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69(8), pp. 2110-2114.
41. Cuéllar T., Pascaud F., Verdeil J.L., Torregrosa L., Adam-Blondon A.F., Thibaud J.B., Sentenac H., Gaillard I. (2010), "A grapevine Shaker inward K⁺ channel activated by the calcineurin B-like calcium sensor 1–protein kinase CIPK23 network is expressed in grape berries under drought stress conditions", *The Plant Journal*. 61(1), pp. 58-69.
 42. D'Halluin L., De Block M., Denecke J., Janssens J., Leemans J., Reynaerts A., Botterman J. (1995), *The bar Gene as Selectable and Screenable Marker in Plant Engineering*, in *Recombinant DNA Methodology II*, Elsevier, pp. 157-168.
 43. D'Amelia L., Dell'Aversana E., Woodrow P., Ciarmiello L.F., Carillo P. (2018), *Metabolomics for crop improvement against salinity stress*, in *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Volume 2, Springer, pp. 267-287.
 44. da Silva E.C., Nogueira R., da Silva M.A., de Albuquerque M.B. (2011), "Drought stress and plant nutrition", *Plant stress*. 5(Special Issue 1), pp. 32-41.
 45. De Ronde J., Cress W., Krüger G., Strasser R., Van Staden J. (2004), "Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress", *Journal of plant physiology*. 161(11), pp. 1211-1224.
 46. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983), "A plant DNA miniprep: version II", *Plant molecular biology reporter*. 1(4), pp. 19-21.
 47. Desai P.N., Shrivastava N., Padh H. (2010), "Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression", *Biotechnology advances*. 28(4), pp. 427-435.

48. Dinneny J.R. (2019), "Developmental responses to water and salinity in root systems", *Annual review of cell and developmental biology*. 35, pp. 239-257.
49. Du Y., Zhao Q., Chen L., Yao X., Zhang W., Zhang B., Xie F. (2020), "Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings", *Plant Physiology and Biochemistry*. 146, pp. 1-12.
50. Fahad S., Ullah A., Ali U., Ali E., Saud S., Rehman K., Turan V. (2019), *Drought tolerance in plants role of phytohormones and scavenging system of ROS*, in Plant Tolerance to Environmental Stress: Role of Phytoprotectants, Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, M T.I., Editors, CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 1-12.
51. Fan F., Gadda G. (2005), "On the catalytic mechanism of choline oxidase", *Journal of the American Chemical Society*. 127(7), pp. 2067-2074.
52. Fan F., Ghanem M., Gadda G. (2004), "Cloning, sequence analysis, and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance", *Archives of biochemistry and biophysics*. 421(1), pp. 149-158.
53. Fan W., Wang H., Zhang P. (2016), *Engineering Glycinebetaine Metabolism for Enhanced Drought Stress Tolerance in Plants*, in Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2, Springer, pp. 513-530.
54. Fang L., Su L., Sun X., Li X., Sun M., Karungo S.K., Fang S., Chu J., Li S., Xin H. (2016), "Expression of *Vitis amurens* NAC26 in Arabidopsis enhances drought tolerance by modulating jasmonic acid synthesis", *Journal of experimental botany*. 67(9), pp. 2829-2845.
55. Fariduddin Q., Varshney P., Yusuf M., Ali A., Ahmad A. (2013), "Dissecting the role of glycine betaine in plants under abiotic stress", *Plant Stress*. 7(1), pp. 8-18.
56. Fedotova M.V., Kruchinin S.E. (2017), "Hydration and ion-binding of glycine betaine: how they may be involved into protection of proteins under

- abiotic stresses", *Journal of Molecular Liquids*. 244, pp. 489-498.
57. Fitzgerald T.L., Waters D.L., Henry R.J. (2009), "Betaine aldehyde dehydrogenase in plants", *Plant biology*. 11(2), pp. 119-130.
 58. Gadda G. (2012), "Oxygen activation in flavoprotein oxidases: the importance of being positive", *Biochemistry*. 51(13), pp. 2662-2669.
 59. Gadda G. (2020), "Choline oxidases", *The Enzymes*. 47, pp. 137-166.
 60. Ganapathi T., Suprasanna P., Rao P., Bapat V. (2004), "Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering", *Indian Journal of Biotechnology*. 3(2), pp. 171-184.
 61. Gao Y., Lynch J.P. (2016), "Reduced crown root number improves water acquisition under water deficit stress in maize (*Zea mays* L.)", *Journal of Experimental Botany*. 67(15), pp. 4545-4557.
 62. Gharibi S., Tabatabaei B.E.S., Saeidi G., Goli S.A.H. (2016), "Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species", *Applied biochemistry and biotechnology*. 178(4), pp. 796-809.
 63. Gill S.S., Tuteja N. (2010), "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", *Plant physiology and biochemistry*. 48(12), pp. 909-930.
 64. Giri J. (2011), "Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants", *Plant signaling & behavior*. 6(11), pp. 1746-1751.
 65. Goel D., Singh A.K., Yadav V., Babbar S.B., Murata N., Bansal K.C. (2011), "Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses", *Journal of plant physiology*. 168(11), pp. 1286-1294.
 66. Grieve C., Grattan S. (1983), "Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds", *Plant and soil*. 70(2), pp. 303-307.

67. Gulevich A., Baranova E. (2008), "Creation of a genetic engineering design with the choline oxidase gene for improved expression in plant", *Russian Agricultural Sciences*. 34(3), pp. 145-148.
68. Gupta A., Rico-Medina A., Caño-Delgado A.I. (2020), "The physiology of plant responses to drought", *Science*. 368(6488), pp. 266-269.
69. Gupta B., Huang B. (2014), "Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization", *International journal of genomics*. 2014, pp. 1-18.
70. Hada A., Krishnan V., Jaabir M.M., Kumari A., Jolly M., Praveen S., Sachdev A. (2018), "Improved *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] following optimization of culture conditions and mechanical techniques", *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 54(6), pp. 672-688.
71. Hao X., Li P., Feng Y., Han X., Gao J., Lin E., Han Y. (2013), "Effects of fully open-air [CO₂] elevation on leaf photosynthesis and ultrastructure of *Isatis indigotica* Fort", *PLoS One*. 8(9), p. e74600.
72. Hayashi H., Mustardy L., Deshnum P., Ida M., Murata N. (1997), "Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress", *The Plant Journal*. 12(1), pp. 133-142.
73. Hessini K., Martínez J.P., Gandour M., Albouchi A., Soltani A., Abdelly C. (2009), "Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*", *Environmental and Experimental Botany*. 67(2), pp. 312-319.
74. Hinchey M.A., Connor-Ward D.V., Newell C.A., McDonnell R.E., Sato S.J., Gasser C.S., Fischhoff D.A., Re D.B., Fraley R.T., Horsch R.B. (1988), "Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer", *Biotechnology*. 6(8), pp. 915-922.

75. Hossain Z., Nouri M.-Z., Komatsu S. (2012), "Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress", *Journal of Proteome Research*. 11(1), pp. 37-48.
76. Hosseini M.S., Samsampour D., Ebrahimi M., Abadía J., Khanahmadi M. (2018), "Effect of drought stress on growth parameters, osmolyte contents, antioxidant enzymes and glycyrrhizin synthesis in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) grown in the field", *Phytochemistry*. 156, pp. 124-134.
77. Hu L., Wang Z., Huang B. (2013), "Effects of cytokinin and potassium on stomatal and photosynthetic recovery of Kentucky bluegrass from drought stress", *Crop Science*. 53(1), pp. 221-231.
78. Huong B.T.T., Gioi D.H., Dung N.M., Ngoc P.B., Ha C.H. (2019), "Evaluation of recombinant expression of *codA* gene regulated by *rd29A* promoter in tobacco ", *Journal of forestry science and technology*. 8, pp. 13-20.
79. Huong B.T.T., Gioi D.H., Thang B.V., Son L.V., Ha C.H. (2016), "Development of *Arthrobacter globiformis codA* gene in improving plant resistance to disadvantageous conditions", *Agriculture Development in the Context of International Integration: Opportunities and Challenges*, pp. 203-215.
80. Hussain S., Rao M.J., Anjum M.A., Ejaz S., Zakir I., Ali M.A., Ahmad N., Ahmad S. (2019), *Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions*, in Plant abiotic stress tolerance, Hasanuzzaman M, Hakeem K.R, Nahar K, Alharby H.F, Editors, Springer, pp. 207-219.
81. Igamberdiev A.U., Kleczkowski L.A. (2018), "The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: the branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism", *Frontiers in plant science*. 9(318), pp. 1-12.
82. Ikuta S., Imamura S., Misaki H., Horiuti Y. (1977), "Purification and

- characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*", *The Journal of Biochemistry*. 82(6), pp. 1741-1749.
83. Ismael K.A., Antar E.-B.N. (2014), "Establishment of high-efficiency *Agrobacterium*-mediated Transformation conditions of soybean callus", *Indian Journal of Biotechnology*. 13(10), pp. 459-463.
 84. Juszczak I., Bartels D. (2017), "*LEA* gene expression, RNA stability and pigment accumulation in three closely related Linderniaceae species differing in desiccation tolerance", *Plant Science*. 255, pp. 59-71.
 85. Karimpour M. (2019), "Effect of drought stress on RWC and chlorophyll content on wheat (*Triticum durum* L.) genotypes", *World Essays Journal*. 7, pp. 52-56.
 86. Ke Q., Wang Z., Ji C.Y., Jeong J.C., Lee H.-S., Li H., Xu B., Deng X., Kwak S.-S. (2016), "Transgenic poplar expressing *codA* exhibits enhanced growth and abiotic stress tolerance", *Plant Physiology and Biochemistry*. 100, pp. 75-84.
 87. Kebede A., Kang M.S., Bekele E. (2019), "Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley", *Advances in Agronomy*. 156, pp. 265-314.
 88. Khan S.H., Ahmad N., Ahmad F., Kumar R. (2010), "Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention", *IUBMB life*. 62(12), pp. 891-895.
 89. Khater M., Dawood M.G., Sadak M.S., Shalaby M., El-Awadi M., El-Din K.G. (2018), "Enhancement the performance of cowpea plants grown under drought conditions via trehalose application", *Middle East Journal*. 7(3), pp. 782-800.
 90. Khelifi L., Titouh-Hadj Moussa K., Cerezo-Medina S., Mercado J., Pliego-Alfaro F., Titouh K. (2012), Evaluation of the Effect of Phosphinothricin, as Selection Agent, on the Growth of Olive Somatic Embryos, VII

International Symposium on Olive Growing 1057, pp. 533-542.

91. Kheradmand M.A., Fahraji S.S., Fatahi E., Raoofi M.M. (2014), "Effect of water stress on oil yield and some characteristics of *Brassica napus*", *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 8(9), pp. 1447-1453.
92. Kunert K.J., Vorster B.J., Fenta B.A., Kibido T., Dionisio G., Foyer C.H. (2016), "Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules", *Frontiers in Plant Science*. 7(1015), pp. 1-7.
93. Li D., Zhang T., Wang M., Liu Y., Brestic M., Chen T.H., Yang X. (2019), "Genetic engineering of the biosynthesis of glycine betaine modulates phosphate homeostasis by regulating phosphate acquisition in tomato", *Frontiers in plant science*. 9(1995), pp. 1-13.
94. Li H., Wang Z., Ke Q., Ji C.Y., Jeong J.C., Lee H.-S., Lim Y.P., Xu B., Deng X.-P., Kwak S.-S. (2014), "Overexpression of *codA* gene confers enhanced tolerance to abiotic stresses in alfalfa", *Plant Physiology and Biochemistry*. 85, pp. 31-40.
95. Li S., Cong Y., Liu Y., Wang T., Shuai Q., Chen N., Gai J., Li Y. (2017), "Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean", *Frontiers in plant science*. 8(246), pp. 1-15.
96. Li Y., Chen Q., Nan H., Li X., Lu S., Zhao X., Liu B., Guo C., Kong F., Cao D. (2017), "Overexpression of *GmFDL19* enhances tolerance to drought and salt stresses in soybean", *PLoS One*. 12(6), p. e0179554.
97. Liang H., Kumar P.A., Nain V., Powell W.A., Carlson J.E. (2010), *Selection and screening strategies*, in *Transgenic Crop Plants*, Springer, pp. 85-143.
98. Licht M.A., Wright D., Lenssen A.W. (2013), "Soybean response to drought", *Agriculture and Environment Extension Publications*. 190, pp. 1-3.
99. Liting W., Lina W., Yang Y., Pengfei W., Tiancai G., Guozhang K. (2015), "Absciscic acid enhances tolerance of wheat seedlings to drought and

- regulates transcript levels of genes encoding ascorbate-glutathione biosynthesis", *Frontiers in plant science*. 6(458), pp. 1-11.
100. Lo T.S., Le H.D., Nguyen V.T.T., Chu H.H., Van Son L., Chu H.M. (2015), "Overexpression of a soybean expansin gene, *GmEXP1*, improves drought tolerance in transgenic tobacco", *Turkish Journal of Botany*. 39(6), pp. 988-995.
 101. Ma X.-J., Yu T.-F., Li X.-H., Cao X.-Y., Ma J., Chen J., Zhou Y.-B., Chen M., Ma Y.-Z., Zhang J.-H. (2020), "Overexpression of *GmNFYA5* confers drought tolerance to transgenic Arabidopsis and soybean plants", *BMC plant biology*. 20(1), pp. 1-18.
 102. Majumdar R., Barchi B., Turlapati S.A., Gagne M., Minocha R., Long S., Minocha S.C. (2016), "Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level", *Frontiers in Plant Science*. 7(78), pp. 1-17.
 103. Mau C.H., Huong N.T.T., Anh N.T., Lan C.H., Son L., Ha C.H. (2010), Characteristics of the gene encoding pyrroline-5-carboxylate synthase (*P5CS*) in Vietnamese soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill), *Proceedings of the International Conference on Biology, Environment and Chemistry*, pp. 319-323.
 104. Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idänheimo N., Hoeberichts F.A., Mühlenbock P., Brosché M., Van Breusegem F., Kangasjärvi J. (2016), "Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling", *Journal of experimental botany*. 67(13), pp. 3831-3844.
 105. Mohamed H.I., Latif H.H. (2017), "Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate", *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 23(3), pp. 545-556.
 106. Mohanty A., Kathuria H., Ferjani A., Sakamoto A., Mohanty P., Murata N., Tyagi A. (2002), "Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1

- harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress", *Theoretical and Applied Genetics*. 106(1), pp. 51-57.
107. Morris E.C., Griffiths M., Golebiowska A., Mairhofer S., Burr-Hersey J., Goh T., Von Wangenheim D., Atkinson B., Sturrock C.J., Lynch J.P. (2017), "Shaping 3D root system architecture", *Current Biology*. 27(17), pp. R919-R930.
 108. Msanne J., Lin J., Stone J.M., Awada T. (2011), "Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes", *Planta*. 234(1), pp. 97-107.
 109. Nadeem M., Li J., Yahya M., Sher A., Ma C., Wang X., Qiu L. (2019), "Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review", *International Journal of Molecular Sciences*. 20(2541), pp. 1-32.
 110. Nguyen H.Q., Le T.H.T., Nguyen T.N.L., Nguyen T.G., Sy D.T., Tu Q.T., Vu T.T.T., Chu H.M., Vu T.K.L. (2020), "Overexpressing *GmCHI1A* increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 56(6), pp. 842-850.
 111. Nguyen L.T.N., Vacixaxa P., Lo T.T.M., Nguyen Y.T.H., Pham N.T.T., Van Le S., Chu M.H. (2019), "Design of construct carrying *GmDREB6* to enhance soybean gene expression related to abiotic stress response", *European Journal of Engineering and Technology Research*. 4(6), pp. 135-139.
 112. Nguyen Q.H., Vu L.T.K., Nguyen L.T.N., Pham N.T.T., Nguyen Y.T.H., Van Le S., Chu M.H. (2019), "Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants", *Scientific reports*. 9(1), pp. 1-8.
 113. Ning W., Zhai H., Yu J., Liang S., Yang X., Xing X., Huo J., Pang T., Yang Y., Bai X. (2017), "Overexpression of *Glycine soja* *WRKY20* enhances

- drought tolerance and improves plant yields under drought stress in transgenic soybean", *Molecular breeding*. 37(19), pp. 1-10.
114. Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002), "Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling", *Journal of experimental botany*. 53(372), pp. 1283-1304.
 115. Olhoft P., Lin K., Galbraith J., Nielsen N., Somers D. (2001), "The role of thiol compounds in increasing Agrobacterium-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells", *Plant Cell Reports*. 20(8), pp. 731-737.
 116. Park E.J., Jeknić Z., Chen T.H., Murata N. (2007), "The *codA* transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato", *Plant biotechnology journal*. 5(3), pp. 422-430.
 117. Park E.J., Jeknić Z., Pino M.T., Murata N., Chen T.H.H. (2007), "Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress", *Plant, cell & environment*. 30(8), pp. 994-1005.
 118. Park E.J., Jeknić Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H. (2004), "Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage", *The Plant Journal*. 40(4), pp. 474-487.
 119. Park J., Lee Y., Martinoia E., Geisler M. (2017), "Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know", *Bmc Biology*. 15(1), pp. 1-15.
 120. Park J.S., Kim H.J., Cho H.S., Jung H.W., Cha J.-Y., Yun D.-J., Oh S.-W., Chung Y.-S. (2019), "Overexpression of *AtYUCCA6* in soybean crop results in reduced ROS production and increased drought tolerance", *Plant Biotechnology Reports*. 13(2), pp. 161-168.
 121. Park S.-C., Kim M.D., Kim S.H., Kim Y.-H., Jeong J.C., Lee H.-S., Kwak

- S.-S. (2015), "Enhanced drought and oxidative stress tolerance in transgenic sweetpotato expressing a *codA* gene", *Journal of Plant Biotechnology*. 42(1), pp. 19-24.
122. Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B., Fonger T.M., Wang K. (2006), "Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation", *Plant cell reports*. 25(3), pp. 206-213.
 123. Pham T.T.N., Nguyen H.Q., Nguyen T.N.L., Dao X.T., Sy D.T., Van Son L., Mau C.H. (2020), "Overexpression of the '*GmDREB2*' gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants", *Australian Journal of Crop Science*. 14(3), pp. 495-503.
 124. Phillips B.B., Shaw R.F., Holland M.J., Fry E.L., Bardgett R.D., Bullock J.M., Osborne J.L. (2018), "Drought reduces floral resources for pollinators", *Global Change Biology*. 24(7), pp. 3226-3235.
 125. Phong N.V., Huong B.T.T., Wang Q. (2019), "Micropropagation jilin small granule soy transferred *GmMYB12A*", *Journal of Forestry Science and Technology*. 7, pp. 3-11.
 126. Qi J., Sun S., Yang L., Li M., Ma F., Zou Y. (2019), "Potassium uptake and transport in apple roots under drought stress", *Horticultural plant journal*. 5(1), pp. 10-16.
 127. Qin D., Zhao C.L., Liu X.Y., Wang P.W. (2017), "Transgenic soybeans expressing betaine aldehyde dehydrogenase from *Atriplex canescens* show increased drought tolerance", *Plant Breeding*. 136(5), pp. 699-709.
 128. Queiroz M.S., Oliveira C.E., Steiner F., Zuffo A.M., Zoz T., Vendruscolo E.P., Silva M.V., Mello B., Cabra R., Menis F.T. (2019), "Drought stresses on seed germination and early growth of maize and sorghum", *Journal of Agricultural Science*. 11(2), pp. 310-318.
 129. Rhodes D., Nadolska-Orczyk A., Rich P. (2002), *Salinity, osmolytes and*

- compatible solutes*, in *Salinity: Environment-plants-molecules*, Springer, pp. 181-204.
130. Rodrigues J., Inzé D., Nelissen H., Saibo N.J. (2019), "Source–sink regulation in crops under water deficit", *Trends in plant science*. 24(7), pp. 652-663.
 131. Roychoudhury A., Banerjee A. (2016), "Endogenous glycine betaine accumulation mediates abiotic stress tolerance in plants", *Tropical Plant Research*. 3(1), pp. 105-111.
 132. Sakamoto A., Murata A.N. (1998), "Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold", *Plant molecular biology*. 38, pp. 1011-1019.
 133. Sakamoto A., Murata N. (2000), "Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance", *Journal of Experimental Botany*. 51(342), pp. 81-88.
 134. Sakamoto A., Murata N. (2001), "The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants", *Plant Physiology*. 125(1), pp. 180-188.
 135. Salazar C., Hernández C., Pino M.T. (2015), "Plant water stress: Associations between ethylene and abscisic acid response", *Chilean journal of agricultural research*. 75, pp. 71-79.
 136. Salehi-Lisar S.Y., Bakhshayeshan-Agdam H. (2016), *Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance*, in *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1, Springer, pp. 1-16.
 137. Salvi F., Rodriguez I., Hamelberg D., Gadda G. (2016), "Role of f357 as an oxygen gate in the oxidative half-reaction of choline oxidase", *Biochemistry*. 55(10), pp. 1473-1484.
 138. Salvi F., Wang Y.-F., Weber I.T., Gadda G. (2014), "Structure of choline oxidase in complex with the reaction product glycine betaine", *Acta*

- Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 70(2), pp. 405-413.
139. Samarah N., Mullen R., Ciazio S. (2004), "Size distribution and mineral nutrients of soybean seeds in response to drought stress", *Journal of Plant Nutrition*. 27(5), pp. 815-835.
 140. Sarani M., Namrudi M., Hashemi S.M., Raoofi M. (2014), "The effect of drought stress on chlorophyll content, root growth, glucosinolate and proline in crop plants", *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 3(9), pp. 994-997.
 141. Sebastian J., Yee M.-C., Viana W.G., Rellán-Álvarez R., Feldman M., Priest H.D., Trontin C., Lee T., Jiang H., Baxter I. (2016), "Grasses suppress shoot-borne roots to conserve water during drought", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(31), pp. 8861-8866.
 142. Seo J.S., Sohn H.B., Noh K., Jung C., An J.H., Donovan C.M., Somers D.A., Kim D.I., Jeong S.-C., Kim C.-G. (2012), "Expression of the *Arabidopsis AtMYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean", *Molecular Breeding*. 29(3), pp. 601-608.
 143. Shahbaz M., Masood Y., Perveen S., Ashraf M. (2012), "Is foliar-applied glycinebetaine effective in mitigating the adverse effects of drought stress on wheat (*Triticum aestivum* L.)?", *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 84(2), p. 192.
 144. Shi H., Chen L., Ye T., Liu X., Ding K., Chan Z. (2014), "Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance", *Plant Physiology and Biochemistry*. 82, pp. 209-217.
 145. Shi S., Fan M., Iwama K., Li F., Zhang Z., Jia L. (2015), "Physiological basis of drought tolerance in potato grown under long-term water deficiency", *International Journal of Plant Production*. 9(2), pp. 305-320.
 146. Shinde S., Villamor J.G., Lin W., Sharma S., Verslues P.E. (2016), "Proline

- coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and mitochondria", *Plant Physiology*. 172(2), pp. 1074-1088.
147. Silva A.J.d., Magalhães Filho J.R., Sales C.R.G., Pires R.C.d.M., Machado E.C. (2018), "Source-sink relationships in two soybean cultivars with indeterminate growth under water deficit", *Bragantia*. 77(1), pp. 23-35.
 148. Solanki J.K., Sarangi S. (2014), "Effect of drought stress on proline accumulation in peanut genotypes", *International journal of advanced research*. 2(10), pp. 301-309.
 149. Somssich M. (2019), *A short history of the CaMV 35S promoter*, PeerJ Preprints.
 150. Su D., Yuan H., Gadda G. (2017), "A reversible, charge-induced intramolecular C4a-S-cysteinyl-flavin in choline oxidase variant S101C", *Biochemistry*. 56(51), pp. 6677-6690.
 151. Sun J., Hu W., Zhou R., Wang L., Wang X., Wang Q., Feng Z., Li Y., Qiu D., He G. (2015), "The *Brachypodium distachyon* BdWRKY36 gene confers tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants", *Plant cell reports*. 34(1), pp. 23-35.
 152. Sun Z., Li H., Zhang L., Ke Q., Wang S., Kwak S.S., Deng X. (2017), "Physiological mechanism of the enhanced drought tolerance in transgenic poplar (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) with *codA* gene", *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 23(1), pp. 60-66.
 153. Tan D.X., Tuong H.M., Thuy V.T.T., Son L.V., Mau C.H. (2015), "Cloning and overexpression of *GmDREB2* gene from a vietnamese drought-resistant soybean variety", *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 58(5), pp. 651-657.
 154. Topping J.F. (1998), *Tobacco transformation*, in *Plant Virology Protocols*, Springer, pp. 365-372.
 155. Ullah A., Manghwar H., Shaban M., Khan A.H., Akbar A., Ali U., Ali E.,

- Fahad S. (2018), "Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy", *Environmental Science and Pollution Research*. 25(33), pp. 33103-33118.
156. Valente M.A.S., Faria J.A., Soares-Ramos J.R., Reis P.A., Pinheiro G.L., Piovesan N.D., Morais A.T., Menezes C.C., Cano M.A., Fietto L.G. (2009), "The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco", *Journal of experimental botany*. 60(2), pp. 533-546.
 157. Verma G., Srivastava D., Tiwari P., Chakrabarty D. (2019), *ROS modulation in crop plants under drought stress*, in Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms, Mirza H., Vasileios F., Kamrun N., Masayuki F., Editors, pp. 311-336.
 158. Vilela R., Bezerra B., Froehlich A., Endres L. (2017), "Antioxidant system is essential to increase drought tolerance of sugarcane", *Annals of Applied Biology*. 171(3), pp. 451-463.
 159. Wang Q., Zhao R., Chen Q., da Silva J.A.T., Chen L., Yu X. (2019), "Physiological and biochemical responses of two herbaceous peony cultivars to drought stress", *HortScience*. 54(3), pp. 492-498.
 160. Wang Q.-b., Xu W., Xue Q.-z., Su W.-a. (2010), "Transgenic *Brassica chinensis* plants expressing a bacterial *codA* gene exhibit enhanced tolerance to extreme temperature and high salinity", *Journal of Zhejiang University Science B*. 11(11), pp. 851-861.
 161. Wang W., Wang C., Pan D., Zhang Y., Luo B., Ji J. (2018), "Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence images of soybean (*Glycine max*) seedlings", *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 11(2), pp. 196-201.
 162. Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. (2018), "Reactive oxygen species

- in plant signaling", *Annual review of plant biology*. 69, pp. 209-236.
163. Watkins J.M., Hechler P.J., Muday G.K. (2014), "Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture", *Plant Physiology*. 164(4), pp. 1707-1717.
 164. Wei D., Zhang W., Wang C., Meng Q., Li G., Chen T.H.H., Yang X. (2017), "Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to alleviate salt-induced potassium efflux and enhances salt tolerance in tomato plants", *Plant Science*. 257, pp. 74-83.
 165. Wei Y., Jin J., Jiang S., Ning S., Liu L. (2018), "Quantitative response of soybean development and yield to drought stress during different growth stages in the Huaibei Plain, China", *Agronomy*. 8(7), p. 97.
 166. Willick I.R., Lahlali R., Vijayan P., Muir D., Karunakaran C., Tanino K.K. (2018), "Wheat flag leaf epicuticular wax morphology and composition in response to moderate drought stress are revealed by SEM, FTIR-ATR and synchrotron X-ray spectroscopy", *Physiologia plantarum*. 162(3), pp. 316-332.
 167. Xiang D.B., Peng L.X., Zhao J.L., Zou L., Zhao G., Song C. (2013), "Effect of drought stress on yield, chlorophyll contents and photosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)", *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 11(3&4), pp. 1358-1363.
 168. Yang J., Xing G., Sui L., Guo D., Niu L., Yang X. (2016), "Effects of different soybean genotypes on the transformation efficiency of soybean and analysis of the T-DNA insertions in the soybean genome", *Soybean Science*. 35(4), pp. 562-567.
 169. Yang X., Lu M., Wang Y., Wang Y., Liu Z., Chen S. (2021), "Response Mechanism of Plants to Drought Stress", *Horticulturae*. 7(3), p. 50.
 170. York L.M., Carminati A., Mooney S.J., Ritz K., Bennett M.J. (2016), "The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil

- influenced by roots", *Journal of experimental botany*. 67(12), pp. 3629-3643.
171. You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Yang X., Zhang J. (2019), "Accumulation of glycine betaine in transplastomic potato plants expressing choline oxidase confers improved drought tolerance", *Planta*. 249(6), pp. 1963-1975.
 172. Yu X., Kikuchi A., Matsunaga E., Morishita Y., Nanto K., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Shimada T., Watanabe K.N. (2009), "Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted-house", *Plant Biotechnology*. 26(1), pp. 135-141.
 173. Yu Y., Liang H., Wang S., Lian Y., Wei Y., Wang T. (2010), "Research progress and commercialization on transgenic soybean in China", *Soybean Science*. 29, pp. 143-150.
 174. Zargar S.M., Gupta N., Nazir M., Mahajan R., Malik F.A., Sofi N.R., Shikari A.B., Salgotra R. (2017), "Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective", *Plant Gene*. 11, pp. 154-159.
 175. Zhang T., Li Z., Li D., Li C., Wei D., Li S., Liu Y., Chen T.H., Yang X. (2020), "Comparative effects of glycinebetaine on the thermotolerance in codA-and BADH-transgenic tomato plants under high temperature stress", *Plant Cell Reports*. 39(11), pp. 1525-1538.
 176. Zhang T., Liang J., Wang M., Li D., Liu Y., Chen T.H., Yang X. (2019), "Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances the fruit development and size of tomato", *Plant Science*. 280, pp. 355-366.
 177. Zhao X., Li G., Liang S. (2013), "Several affinity tags commonly used in chromatographic purification", *Journal of analytical methods in chemistry*. 2013(581093), pp. 1-8.
 178. Zheng G., Fan C., Di S., Wang X., Xiang C., Pang Y. (2017), "Over-expression of *Arabidopsis* EDT1 gene confers drought tolerance in alfalfa

- (*Medicago sativa* L.)", *Frontiers in plant science*. 8(2125), pp. 1-14.
179. Zoz T., Steiner F., Guimarães V.F., Castagnara D.D., Meinerz C.C., Fey R. (2013), "Peroxidase activity as an indicator of water deficit tolerance in soybean cultivars", *Bioscience Journal*. 29(5), pp. 1664-1671.
 180. Zulfiqar F., Younis A., Riaz A., Mansoor F., Hameed M., Akram N.A., Abideen Z. (2020), "Morpho-anatomical adaptations of two *Tagetes erecta* L. cultivars with contrasting response to drought stress", *Pakistan Journal of Botany*. 52(3), pp. 801-810.

PHỤ LỤC

Phục lục 1. Gen *codA* tổng hợp nhân tạo và gen *codA* của *A. globiformis*

P1.1. Trình tự gen *codA* tổng hợp nhân tạo và gen *codA* của *A. globiformis* [79]

AY304485	10 20 30 40 50 60 70 80
CODA-TT-NT	ATGGCACAAATTAAACAACATGGCACAAGGGATACAAACCCCTTAATCCCAATTCCAATTTCCATAAACCCCAAGTTCCTAA
AY304485	90 100 110 120 130 140 150 160
CODA-TT-NT	ATCTTCAAGTTTTCTTGTTTTGGATCTAAAAAACTGAAAAATTCAGCAAAATCTATGTTGGTTTTGAAAAAGATTCAA
TP	
AY304485	170 180 190 200 210 220 230 240
CODA-TT-NT	TTTTTATGCAAAAGTTTTGTCCCTTAGGATTTTCTAGCATCAGTGGCTACAGCCTGCATGCACATCGACAACATCGAGAAC
AY304485	250 260 270 280 290 300 310 320
CODA-TT-NT	CTGAGCGACAGGGAGTTCGACTACATCGTCTCGGCGGGCGGGTCCGCCGGGGCCGCCGTCGCCGCCCGGCTGAGCGAGGA
AY304485	330 340 350 360 370 380 390 400
CODA-TT-NT	TCCCGCAGTGAGCGTGGCGCTGGTGGAGGCCGGCCCGGATGACCGCGCGTGCCTCCGAGGTGCTGCAGCTGGACCGCTGGA
AY304485	410 420 430 440 450 460 470 480
CODA-TT-NT	TGGAGCTGCTGGAATCGGGCTACGACTGGGACTACCCGATCGAGCCGCAGGAGAACGGCAACTCCTTCATGCCCATGCC
AY304485	490 500 510 520 530 540 550 560
CODA-TT-NT	CGTGCCAAGGTGATGGGCGGCTGCTCCAGCCACAACCTCCTGCATCGCCTTCTGGGCCCGCGCGAGGACCTGGACGAGTG
AY304485	570 580 590 600 610 620 630 640
CODA-TT-NT	GGAGGCCAAGTACGGCGCCACCGGCTGGAACGCCGAGGCGGCCCTGGCCGCTGTACAAGCGGCTGGAACCAACGAGGACG
AY304485	650 660 670 680 690 700 710 720
CODA-TT-NT	CGGGCCCGGACGCGCCGACCCACGGGACTCCGGCCCCGTGCACCTGATGAACGTGCCCCGAAGGACCCGACCGGCGTC
AY304485	730 740 750 760 770 780 790 800
CODA-TT-NT	GCGCTCCTGGACGCTGCGAGCAGGCCGCGATCCCGCGCGCAAGTTCAACACCGGCACCACCGTGGTCAACGGCGCCAA

P1.2. So sánh trình tự amino acid của choline oxidase mã hóa bởi gen *codA* tổng hợp nhân tạo với gen *codA* của *A. globiformis* [79]

AY304485
CODA-TT-NT

10 20 30 40 50 60 70 80

MAQINNMAQGIQTLNPNNSNFHKPQVPKSSSFLVFGSKKLKNSANSMLVLKKDSIFMQKFCFSFRISASVATACMHIDNTIEN

90 100 110 120 130 140 150 160

LSDREFDYIVVGGGSAGAAVAARLSEDPVSVVALVEAGPDDRGVPEVLQLDRWMELLESGYDWDYPIEPQENGNSFMRHA

170 180 190 200 210 220 230 240

RAKVMGGCSSHNSCIAFWAPREDLDEWEAKYGATGWNAAAWPLYKRLETNEDAGPDAPHHGDSGPHVLMNVPPKDPPTGV

250 260 270 280 290 300 310 320

ALLDACEQAGIPRAKFNTCTTVVNGANFFQINRRADGTRSSSSVSYIHPIVEQENFTLLTGRLARQLVFDADRRCTGVDI

330 340 350 360 370 380 390 400

VDSAFGHHTRLTARNEVVLSTGAIDTPKLMLSGIGPAAHLAEHGIEVLVDSPGVGEHLQDHPGEGVVQFEAKQPMVAEST

410 420 430 440 450 460 470 480

QWWEIGIFTPTEDGLDRPDLMHGYGVPFDMNTRLRHGYPTTENGFSLTPNVTHARSRGTVRLRSRDFRDKPMVDPRYFTD

490 500 510 520 530 540 550 560

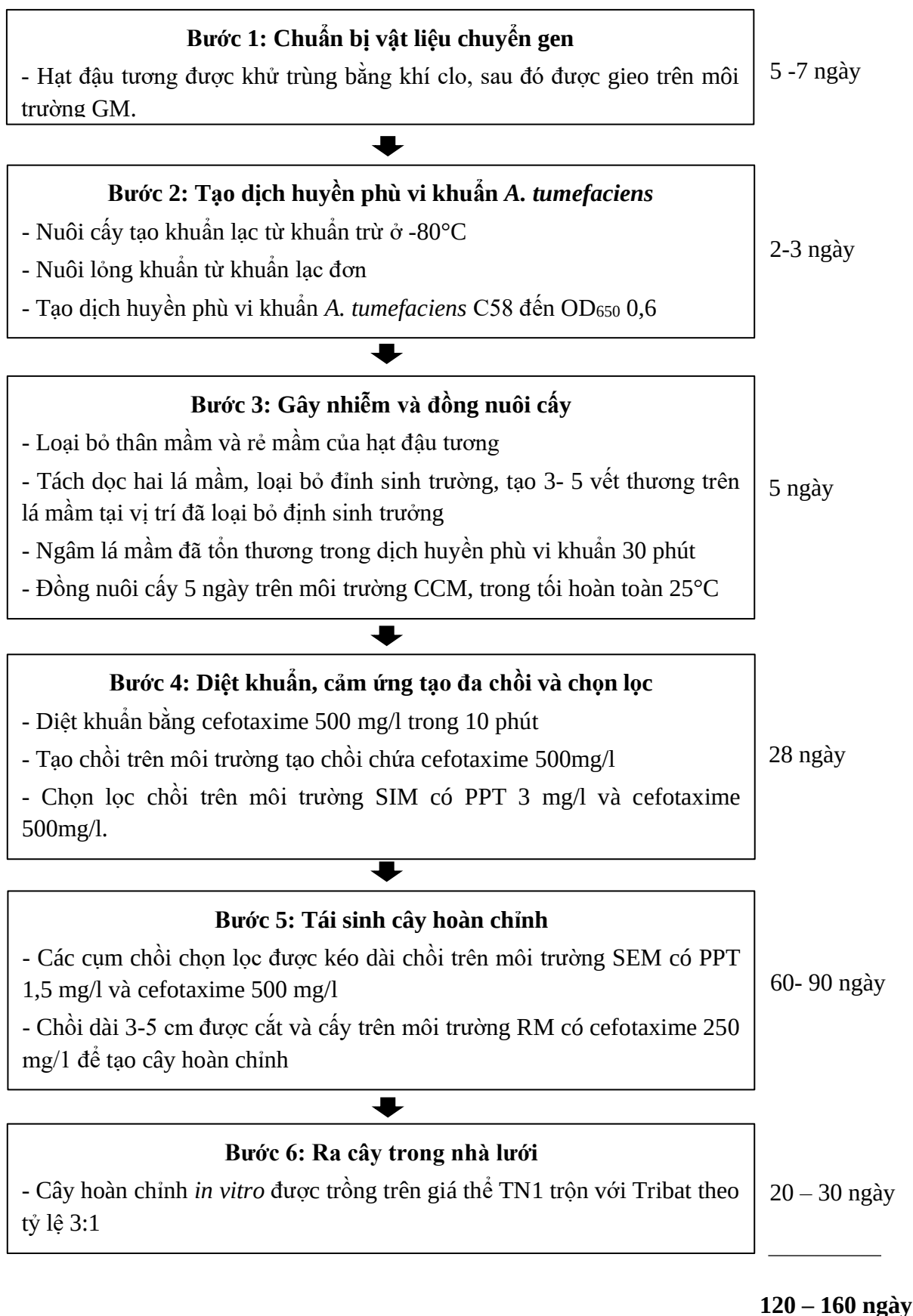
PEGHDMRVMVAGIRKAREIAAQPAMAEWGTRELSPGVEAQTDEELQDYIRKTHNTVYHPVGTVRMGAVEDEMSPLDPELR

570 580 590 600 610 620

VKGVTLRVADASVMPEHVTVPNIIVMMIGERCADLIRSARAGETTTADAELSAALA

OKLISEEDLN

Phục lục 2. Quy trình chuyển gen *codA* vào giống đậu tương DT22



Bước 1. Chuẩn bị vật liệu chuyển gen

Hạt đậu tương (ĐT22) to tròn đều, màu vàng sáng, vỏ hạt không bị nứt được chọn làm vật liệu chuyển gen. Hạt chín được khử trùng bằng khí Chlore (Cl_2) đây là chất độc cực mạnh và có khả năng khử trùng cao, khí clo được tạo ra bằng cách bổ sung 3 ml HCl đậm đặc vào 100 ml javen thương phẩm. Việc khử trùng được thực hiện trong một bình kín và đặt trong tủ hút 14- 16 giờ. Sau khi khử trùng, hạt được gieo trên môi trường GM trong các thời gian 5-7 ngày.

*Bước 2. Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens**

Nuôi cấy tạo khuẩn lạc: cấy trái *A. tumefaciens* mang gen *codA* từ ống giữ chủng lên môi trường YEP đặc, có bổ sung kháng sinh phù hợp, nuôi trong tủ ôn nhiệt 28°C trong thời gian 48 giờ.

Nuôi lỏng khuẩn: dùng que cấy chọn một khuẩn lạc riêng biệt trên đĩa khuẩn cấy vào môi trường YEP lỏng bổ sung các loại kháng sinh như nuôi đặc. Bình nuôi lỏng được lắc 200 v/p ở 28°C trong 16 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn: dịch khuẩn thu từ quá trình nuôi lỏng được hòa loãng 2 - 3 lần và tiếp tục nuôi phục hồi 2 - 4 giờ. Sau đó dịch khuẩn được ly tâm ở 5000 v/p trong 10 phút ở 4°C . Loại bỏ phần dịch nổi và hòa tan cặn khuẩn trong môi trường CCM lỏng có bổ sung acetosyringone để đạt mật độ huyền phù vi khuẩn OD_{650} 0,6.

Các loại môi trường sử dụng cho quá trình nuôi cấy tạo dịch huyền phù vi khuẩn gồm: môi trường nuôi khuẩn đặc, môi trường nuôi khuẩn lỏng và môi trường tạo dịch huyền phù vi khuẩn.

Bước 3. Gây nhiễm và đồng nuôi cấy:

Hạt đậu tương sau 5-7 ngày gieo, phần thân mầm và rễ mầm bị loại bỏ, hai lá mầm được tách ra, đỉnh sinh trưởng bị loại bỏ, tạo 3-5 vết thương trên lá mầm tại vị trí đã loại bỏ đỉnh sinh trưởng. Lá mầm sau khi tạo tổn thương được ngâm trong

dịch huyền phù vi khuẩn trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, mẫu được đặt trên môi trường đồng nuôi cấy đặt các mẫu ở 25°C trong điều kiện tối thời gian là 5 ngày.

Bước 4. Diệt khuẩn, cảm ứng tạo đa chồi và chọn lọc:

Mẫu biến nạp sau thời gian đồng nuôi cấy được lắc trong môi trường SIM lỏng có bổ sung cefotaxime 500 mg/l trong 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và cấy mẫu lên môi trường tạo chồi có bổ sung cefotaxime 500 mg/l. Sau 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường chọn lọc SIM có bổ sung cefotaxime 500 mg/l, PPT 3 mg/l và nuôi trong 2 tuần.

Bước 5. Tái sinh cây hoàn chỉnh:

Các cụm chồi được tạo ra trên môi trường chọn lọc SIM được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM có bổ sung 500 mg/l cefotaxime và 1,5 mg/l PPT. Các chồi phát triển đạt chiều cao từ 3 - 5 cm được cắt và cấy trên môi trường ra rễ RM có bổ sung cefotaxime 250 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh.

Bước 6. Ra cây trong nhà lưới:

Khi cây *in vitro* có 3 lá, có bộ rễ đảm bảo (thường sau 2 tuần nuôi cấy) được lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch phần agar bám trên rễ và trồng trên giá thể TN1 trộn với Tribat theo tỷ lệ 3:1. Cây sống sót trên giá thể được đưa ra chậu đất có bổ sung phân bón trong điều kiện nhà lưới. Khi cây xuất hiện các lá mới, PPT 250mg/l được phết lên lá nhằm đánh giá biểu hiện của gen chọn lọc (bar). Mẫu lá của cây chuyển gen cũng được thu thập và phân tích bằng các đánh giá ở mức độ phân tử.

Phụ lục 3. Kết quả kiểm tra PPT 250mg/l và PCR các dòng T₀, T₁

P3.1. Kết quả kiểm tra các dòng *rd29A-codA* T₀, T₁ bằng PPT 250mg/l và PCR

T ₀				T ₁			
STT	Tên dòng	PCR	PPT	Tên dòng	PPT	PCR	Số hạt thu
1	rd29A-codA 1	-	++	rd29A-codA 1.1	---	-	
				rd29A-codA 1.2	---	-	
2	rd29A-codA 2	+	+++	rd29A-codA 2.1	+++	+	100 - 150
3	rd29A-codA 3	+	- ++	rd29A-codA 3	+++	+	100 - 150
4	rd29A-codA 4	+	++	rd29A-codA 4.1	---	-	
				rd29A-codA 4.2	+++	+	100 - 150
5	rd29A-codA 5	+	++	rd29A-codA 5.1	- + -	-	
				rd29A-codA 5.2	+ - -	-	
				rd29A-codA 5.3	---	-	
6	rd29A-codA 6	+	+++	rd29A-codA 6.1	---	-	
				rd29A-codA 6.2	---	-	
				rd29A-codA 6.3	---	-	
7	rd29A-codA 7	+	+++	rd29A-codA 7.1	-- +	+	100 - 150
				rd29A-codA 7.2	---	-	
8	rd29A-codA 8	+	+++	rd29A-codA 8.1	---	-	
				rd29A-codA 8.2	---	-	
9	rd29A-codA 9	+	+++	rd29A-codA 9	---	-	
10	rd29A-codA 10	+	++	rd29A-codA 10.1	---	-	
				rd29A-codA 10.2	---	-	

-: Kết quả âm tính; +: Kết quả dương tính;

P3.2. Kết quả kiểm tra các dòng 35S-codA T₀, T₁ bằng PPT 250mg/l và PCR

T ₀				T ₁			
STT	Tên dòng	PCR	PPT	Tên dòng	PPT	PCR	Số hạt thu
1	35S-codA 2	+ -	+	35S-codA 2.1	- - -	-	
				35S-codA 2.2	- - -	-	
				35S-codA 2.3	- - -	-	
2	35S-codA 6	+	+	35S-codA 6.1	- - -	-	
				35S-codA 6.2	- - -	-	
				35S-codA 6.3	- - -	-	
3	35S-codA 7	+ +	+	35S-codA 7.1	- - -	-	
				35S-codA 7.2	- - -	-	
				35S-codA 7.3	- - -	-	
4	35S-codA 8	+ -	+	35S-codA 8.1	- - -	-	
				35S-codA 8.2	- - -	-	
				35S-codA 8.3	- - -	-	
				35S-codA 8.4	- - -	-	
5	35S-codA 9	+ -	+	35S-codA 9.1	- - -	-	
				35S-codA 9.2	- - -	-	
				35S-codA 9.3	- - -	-	
6	35S-codA 11	- +	+	35S-codA 11.1	- - -	-	
				35S-codA 11.2	- - -	-	
				35S-codA 11.3	- - -	-	
7	35S-codA 13	- +	+	35S-codA 13.1	- - -	-	
				35S-codA 13.2	- - -	-	

T ₀				T ₁			
STT	Tên dòng	PCR	PPT	Tên dòng	PPT	PCR	Số hạt thu
				35S-codA 13.3	- - -	-	
8	35S-codA 20	+	+	35S-codA 20.1	- - -	-	
				35S-codA 20.2	- - -	-	
				35S-codA 20.3	- - -	-	
9	35S-codA 23	- +	+	35S-codA 23.1	- - -	-	
				35S-codA 23.2	- - -	-	
				35S-codA 23.3	- - -	-	
				35S-codA 23.4	- - -	-	
10	35S-codA 27	+ -	+	35S-codA 27.1	- - -	-	
				35S-codA 27.2	- - -	-	
				35S-codA 27.3	- - -	-	

-: Kết quả âm tính; +: Kết quả dương tính;

P3.3. Kết quả kiểm tra các dòng *HSP-codA* T₀, T₁ bằng PPT 250mg/l và PCR

T ₀				T ₁			
STT	Tên dòng	PCR	PP T	Tên dòng	PPT	PCR	Số hạt thu
1	HSP-codA 1	+ +	+	HSP-codA 1.1	---	-	
				HSP-codA 1.2	---	-	
2	HSP-codA 3	+ +	+	HSP-codA 3.1	---	-	
				HSP-codA 3.1	---	-	
				HSP-codA 3.2	+++	+	250 -300
				HSP-codA 3.3	---	-	
3	HSP-codA 4	- + +	-	HSP-codA 4.1	---	-	
				HSP-codA 4.2	---	-	
				HSP-codA 4.3	---	-	
4	HSP-codA 5	+ - +	+	HSP-codA 5	---	-	
5	HSP-codA 6	+++	+	HSP-codA 6	---	-	
6	HSP-codA 8	-	+	HSP-codA 8.1	---	-	
				HSP-codA 8.2	---	-	
				HSP-codA 8.3	---	-	
7	HSP-codA 11	- + +	+	HSP-codA 11	+++	+	4
8	HSP-codA 12	+	+	HSP-codA 12	---	-	
9	HSP-codA 14	- +	+	HSP-codA 14.1	---	-	
				HSP-codA 14.2	---	-	
10	HSP-codA 17	- - +	-	HSP-codA 17.1	---	-	
				HSP-codA 17.2	---	-	
				HSP-codA 17.3	---	-	
				HSP-codA 17.4	---	-	

-: Kết quả âm tính; +: Kết quả dương tính;