

EXPRESSION ANALYSIS OF THE *GmDREB6* GENE FROM SOYBEAN ON TRANSGENIC TOBACCO PLANTS UNDER THE SALINE-STRESS CONDITION

Nguyen Thi Ngoc Lan^{1*}, Tran Thi Thom², Chu Hoang Mau¹

¹TNU - University of Education

²Bac Ninh Department of Education and Training

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/5/2021 Revised: 02/6/2021 Published: 07/6/2021	This study presents the analytic results of the <i>GmDREB6</i> gene expression level from soybean on transgenic tobacco plants under saline-stress conditions. The structure carrying the <i>GmDREB6</i> transgene was transformed into leaf tissue of tobacco variety K326 through <i>A. tumefaciens</i> and produced 60 transgenic tobacco plants grown in net houses. Two <i>GmDREB6</i> transgenic tobacco lines T01 and T09 were selected from the results of PCR, RT-PCR, qRT-PCR analysis. Under saline-stress conditions, the transcription level of the <i>GmDREB6</i> gene in two transgenic tobacco lines T ₀₁ and T ₀₉ increased from 2.40-3.22 (times) compared to the condition without saline treatment by NaCl ($P < 0.05$). The <i>GmDREB6</i> gene may be a potential candidate in the research and development of salt-tolerant crops to cope with climate change and salinity caused by sea-level rise.
KEYWORDS Gene expression <i>GmDREB6</i> gene qRT-PCR Salt tolerance Saline- stress	

PHÂN TÍCH SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN *GmDREB6* TỪ ĐẬU TƯƠNG TRÊN CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN TRONG ĐIỀU KIỆN STRESS MẶN

Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Trần Thị Thom², Chu Hoàng Mậu¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Sở Giáo dục và Đào tạo Bắc Ninh

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/5/2021 Ngày hoàn thiện: 02/6/2021 Ngày đăng: 07/6/2021	Nghiên cứu này trình bày kết quả phân tích mức độ biểu hiện của gen <i>GmDREB6</i> từ đậu tương trên cây thuốc lá chuyển gen dưới điều kiện stress mặn. Cấu trúc mang gen <i>GmDREB6</i> đã được biến nạp vào mô lá của giống thuốc lá K326 thông qua <i>A. tumefaciens</i> và tạo được 60 cây thuốc lá chuyển gen trồng trong nhà lưới. Hai dòng thuốc lá chuyển gen <i>GmDREB6</i> T ₀₁ và T ₀₉ được chọn từ kết quả phân tích PCR, RT-PCR, qRT-PCR. Trong điều kiện stress mặn, mức độ phiên mã của gen <i>GmDREB6</i> ở hai dòng thuốc lá chuyển gen T ₀₁ và T ₀₉ đã tăng từ 2,40-3,22 (lần) so với điều kiện không xử lý mặn bởi NaCl ($P < 0,05$). Gen <i>GmDREB6</i> có thể là một ứng cử viên tiềm năng trong nghiên cứu phát triển cây trồng chịu mặn ứng phó với biến đổi khí hậu và nhiễm mặn do nước biển dâng.
TỪ KHÓA Biểu hiện gen <i>GmDREB6</i> gen qRT-PCR Tính chịu mặn Stress mặn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4519>

* Corresponding author. Email: ntnlan.dhsptn@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Biến đổi khí hậu, nước biển dâng và sự xâm nhập mặn ngày càng gia tăng ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Sự xâm thực của nước biển vào đất, sử dụng nước tưới chất lượng thấp, sử dụng nhiều phân bón hóa học và thâm canh quanh năm đã đẩy nhanh quá trình tích tụ muối, gây nhiễm mặn đất trồng [1]. Độ mặn là một stress phi sinh học ngăn cản sự tăng trưởng, phát triển và làm giảm năng suất của thực vật. Độ mặn cao có tác động tiêu cực đến các quá trình sinh học trong thực vật, chẳng hạn như phá vỡ cân bằng thẩm thấu và ion, tổng hợp protein, quang hợp, năng lượng và chuyển hóa lipid [2]. Tính chịu mặn của thực vật là khả năng chống lại stress muối liên quan đến các quá trình sinh lý phức tạp, các con đường trao đổi chất và sự biểu hiện của các gen liên quan [3]. Các cơ chế sinh lý và sinh hóa khác nhau trong tế bào đã giúp thực vật tồn tại, sinh trưởng và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao. Đó là sự cân bằng nội môi và ngăn ngừa ion, vận chuyển và hấp thu ion, sinh tổng hợp các chất bảo vệ thẩm thấu và các chất hòa tan tương thích, kích hoạt enzym chống oxy hóa và tổng hợp các hợp chất chống oxy hóa, tổng hợp polyamine, tạo oxit nitric (NO) và điều chế hormon [3].

Thực vật sống trong điều kiện stress mặn biểu hiện các triệu chứng hoặc phản ứng sinh lý phổ biến do sự tích tụ mức độ độc hại của các ion (Na^+ , Cl^- và SO_4^{2-}) trong tế bào của chúng, dẫn đến mất cân bằng dinh dưỡng, thẩm thấu và mất nước [4], [5]. Hơn nữa, các loại phản ứng oxy hóa (Reactive oxygen species-ROS) đã tạo ra các gốc tự do, chẳng hạn như superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), gốc hydroxyl ($\text{OH}^{\cdot}$) và hydrogen peroxide (H_2O_2) tích tụ trong các cây bị stress do muối [6], [7]. Hiện tượng này có thể dẫn đến thành tế bào thực vật có thể bị phá vỡ, làm cho tế bào thực vật chết [4], [5]. Sự tích tụ các ion Na^+ và Cl^- trong dung dịch đất dẫn đến gây độc tế bào và tại đó các ion này gây trở ngại sự trao đổi các nguyên tố thiết yếu khác, chẳng hạn như canxi và kali [8]. Schubert và cộng sự đã chứng minh rằng, sự giãn nở của thành tế bào đã ức chế sự phát triển của tế bào trong giai đoạn đầu của stress do muối [9]. Thành tế bào hoạt động mở rộng làm lỏng lẻo các cấu trúc, điều chỉnh sự kéo dài của tế bào ở pH <5 [10]. Quá trình thẩm thấu chủ yếu được đáp ứng với sự tích tụ các chất hòa tan trong điều kiện hạn và mặn để hạ thấp thế năng nước mà không làm giảm hàm lượng nước thực tế [11]. Đường hòa tan, proline, glycine betaine, axit hữu cơ là một số chất thẩm thấu chính. Báo cáo của Kaya và cộng sự (2010) đã chỉ ra rằng, sự tích lũy proline đã tăng lên ở cây ngô khi gặp điều kiện stress mặn [12]. Hơn nữa, các gen mã hóa các enzyme tổng hợp proline và arginine và một số gen khác có thể có vai trò quan trọng trong khả năng chịu mặn ở cây *S. chilense* [13].

Nhân tố phiên mã đóng vai trò điều khiển quan trọng đối với những thay đổi trong biểu hiện gen và phản ứng với các stress phi sinh học từ môi trường. Các protein DREB là nhóm nhân tố phiên mã được nghiên cứu thành công nhất trong điều kiện stress phi sinh học, bởi vì nó kích hoạt sự biểu hiện của nhiều gen mục tiêu theo hướng xuôi dòng (phía hạ lưu) [14]. Proline là chất thẩm thấu phổ biến tăng lên khi thực vật sống trong điều kiện khô hạn và mặn. Sự tích lũy của proline làm tăng áp suất thẩm thấu, do đó cải thiện khả năng chịu mặn của thực vật. Zhang và cộng sự (2013) đã nghiên cứu sự biểu hiện của *OsDREB2A* và chứng minh rằng sự biểu hiện của gen này làm tăng sự biểu hiện của gen *GmDREB6* và *GmP5CS* ở cây đậu tương [15].

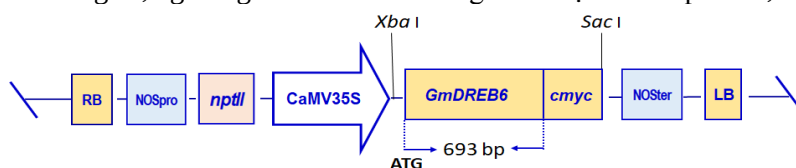
Trong số 18 gen *GmDREB* của đậu tương đã được xác định [16], một số gen đã được làm rõ chức năng. Gen *GmDREB1* có chức năng chịu nóng, hạn và lạnh, *GmDREB2* được xác nhận làm tăng khả năng chịu hạn, chịu muối của cây chuyển gen [17]-[19]... Gen *GmDREB6* thuộc phân họ gen *DREB* có trong hệ gen đậu tương. Đoạn mã hóa của gen *GmDREB6* ở đậu tương có kích thước là 693 bp, mã hóa protein *DREB6* gồm 230 amino acid [20]. Bước đầu nghiên cứu biểu hiện gen *GmDREB6* cho thấy sự biểu hiện quá mức gen *GmDREB6* đã làm tăng sự tích lũy proline và nâng cao khả năng chịu mặn của cây đậu tương biến đổi gen [21]. Mục tiêu của nghiên cứu này là tiếp tục chứng minh vai trò của gen *GmDREB6* của đậu tương thông qua phân tích mức độ biểu hiện trên cây thuốc lá chuyển gen trong điều kiện stress mặn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 *in vitro* và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc pBI121 - *GmDREB6* được lưu giữ tại Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Vector chuyển gen pBI121_ *GmDREB6* trong vi khuẩn *A. tumefaciens* có cấu trúc thể hiện ở hình 1.

Môi trường tái sinh cây thuốc lá được sử dụng trong biến nạp di truyền gen *GmDREB6* vào mô lá thuốc lá, bao gồm môi trường đồng nuôi cây (Co-cultivation medium-CCM), môi trường tái sinh chồi (Shoot induction medium-SIM) và môi trường ra rễ (Rooting medium -RM). Thành phần của môi trường CCM gồm MS cơ bản, aga 10 gL⁻¹, sucrose 30 gL⁻¹, BAP 1 mgL⁻¹, 100 µl AS; SIM gồm MS cơ bản, BAP 1 mgL⁻¹, sucrose 30 gL⁻¹, agar 9 gL⁻¹; RM gồm MS cơ bản, IBA 0,1 mgL⁻¹, sucrose 30 gL⁻¹, agar 9 gL⁻¹. Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng.



Hình 1. Sơ đồ vector pBI121_ *GmDREB6* được sử dụng biến nạp vào thuốc lá qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium* LB và RB: vùng biên trái và phải; *nptII*: neomycin-phospho-transferase II; CaMV35S: promoter 35S của virus khảm súp lơ; *GmDREB6* *cmv*: Gen DREB6 của đậu tương gắn một trình tự nucleotide mã hóa peptide *cmv*. *Xba* I và *Sac* I: vị trí cắt của các enzym giới hạn

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Biến nạp cấu trúc mang gen *GmDREB6* vào thuốc lá và tạo cây chuyển gen

Thí nghiệm chuyển gen vào mô lá cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 thông qua *A. tumefaciens* được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) [22]. Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* cây thuốc lá được thực hiện trong phòng nuôi cấy. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 Lux.

2.2.2. Phân tích sự có mặt và sự biểu hiện ở mức độ phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trên cây thuốc lá chuyển gen

DNA tổng số từ các mẫu lá non được tách chiết theo phương pháp của Saghai và cộng sự (1984) [23]. RNA tổng số được tách chiết từ lá của các cây thuốc lá biến nạp và cây không biến nạp (wild type – WT) bằng Trizol® LS reagent theo hướng dẫn của hãng (Ambion - Life Technology Corporation, Mỹ). RNA có chất lượng tốt được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Mỹ).

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm xác định sự có mặt của gen chuyển trong các cây thuốc lá được biến nạp. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0%. Cặp mồi đặc hiệu *GmDREB6-F*/*GmDREB6-R* cho PCR có trình tự nucleotide là:

*Xba*I-*DREB6-F*: 5'- ATGAAGTTCAACCAACCACTTCAT-3'
*DREB6-Sac*I-R: 5'-ATTGAGATCCTCTTCTGAGATGAGT-3'

Đoạn DNA được nhân bản dự kiến có kích thước là 693 bp. Thành phần phản ứng PCR nhân bản đoạn gen *GmDREB6* gồm 12,5 µl PCR Master Mix 2 X; 1,0 µl mồi *DREB6-F* 10 pmol/ µl; 1,0 µl mồi *DREB6-R* 10 pmol/µl; 8,5 µl nước khử ion. Chu trình nhiệt của PCR gồm giai đoạn biến tính ở 95°C trong 5 phút; và 30 chu kỳ với (1) Biến tính ở 95°C trong 30 giây, (2) Tiếp hợp mồi ở 55°C trong 30 giây, (3) Tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 giây. Hoàn tất ở 72°C trong 8 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C .

2.2.3. Xử lý mẫu nhân tạo

Cây thuốc lá WT và cây thuốc lá biến nạp gen *GmDREB6* *in vitro* được trồng trong các chậu kích thước 115 x 85 x 105 có chứa 3 kg đất và phân bón đã được xử lý sạch, mỗi lô thí nghiệm 10 cây. Các chậu được đặt trong nhà lưới có mái che. Sau khi cây được 4-5 lá thì tiến hành xử lý mặn nhân tạo bằng cách tưới 200 ml NaCl 200 mM hàng ngày trong vòng 4 tuần. Các cây đối chứng được tưới H₂O cho NaCl với lượng tương đương. Theo dõi quá trình phát triển của cây trong quá trình tưới dung dịch NaCl và H₂O.

2.2.4. Phân tích biểu hiện của gen *GmDREB6* bằng kỹ thuật *real-time quantitative reverse transcription PCR* (qRT-PCR)

Phản ứng qRT-PCR được thực hiện với thể tích 20 µl sử dụng 10 µl SYBR Premix Ex Taq II; 0,75 µl mỗi xuôi (forward) 10 mM; 0,75 µl mỗi ngược (reverse) 10 mM (Bảng 1), nước deion free-DNase và 1 µl cDNA. Các bước thực hiện phản ứng khuếch đại bao gồm: giữ ở 95°C trong 3 phút, thực hiện khuếch đại trong 40 chu kỳ theo các bước 95°C trong 10 giây, gắn mồi ở 60°C trong 20 giây, kéo dài ở 72°C trong 20 giây. Các phản ứng được lặp lại 3 lần. Kết quả được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Q-Rex version 1.0.0 (QIAGEN, Đức) và phương pháp Livak's - $\Delta\Delta$ CT được sử dụng để phân tích dữ liệu biểu hiện gen [24].

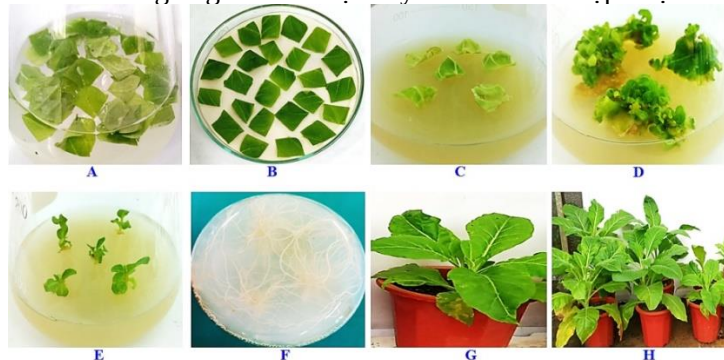
Bảng 1. Trình tự nucleotide của các mồi được sử dụng trong phân tích Real time RT-PCR (qRT-PCR)

Tên mồi	Trình tự	Nhiệt độ gắn mồi (°C)
qRT-DRED6_F/	TAATGAAGGCAAGCACCTAC	60
qRT-DREDB6_R	CGTCGGCTAATTCTGGGAAA	60
qRT-ActN_F	GATCTTGCTGGTCTGTCATCTT	60
qRT-ActN_R	GTCTCCAACCTCTTGCTCATAGTC	60

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* vào thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*

Trong nghiên cứu này, cấu trúc *pBI121_GmDREB6* được biến nạp vào cây thuốc lá *N. tabacum* giống K326 thông qua chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58. Các mảnh lá bánh tẻ được gây tổn thương bằng cách cắt thành những mảnh có kích thước khoảng 1 cm² và nuôi cấy trên môi trường cảm ứng MS trước khi biến nạp 48 giờ. Quá trình biến nạp bằng cách ngâm các mảnh lá mang cấu trúc gen chuyển trong dịch huyền phù *A. tumefaciens*, thời gian 20 phút. Quá trình biến nạp gen *GmDREB6* vào mô lá thuốc lá giống K326 và tạo cây thuốc lá biến nạp được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Biến nạp gen *GmDREB6* vào mô lá thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* và tái sinh cây biến nạp.

A: Các mảnh lá được lây nhiễm bằng cách ngâm vào dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6* trong 30 phút; B: Các mẫu biến nạp được nuôi cấy trong tối trên môi trường đồng nuôi cấy trong 3 ngày, sau đó rửa khuẩn bằng kháng sinh cefotaxim 400 mgL⁻¹; C, D: Các mẫu biến nạp được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng tạo đa chồi, bổ sung BAP 1 mgL⁻¹ và kanamycin 50 mgL⁻¹; E, F: Các chồi mập, cao, xanh và sinh trưởng tốt được tách ra từ cụm chồi và tái sinh rễ trong môi trường ra rễ, bổ sung IBA 0,1 mgL⁻¹ và kanamycin 50 mgL⁻¹; G, H: Cây biến nạp được chuyển sang bầu chứa hỗn hợp đất thịt, than trấu, xơ dừa theo tỷ lệ 2: 1: 2 trong điều kiện nhà lưới.

Kết quả chuyển gen *GmDREB6* vào cây thuốc lá K326 cho thấy, sau 3 lần biến nạp, với 105 mẫu biến nạp có 95 mảnh lá sống sót và tạo được cụm chồi. Các cụm chồi hình thành được đưa sang môi trường chọn lọc và kéo dài chồi. Số chồi được tái sinh là 265 và số chồi sống sót được đưa vào môi trường ra rễ là 206. Số cây ra rễ sống sót được đưa ra bầu đất và lựa chọn 60 cây sinh trưởng tốt đem trồng tại nhà lưới. Trong khi đó, ở lô ĐC1 với 35 mảnh lá lại không có mẫu nào sống sót trong môi trường chọn lọc bằng kháng sinh; còn ở lô ĐC0 chọn 20 cây xanh tốt, khỏe mạnh trồng ra nhà lưới làm đối chứng (Bảng 2).

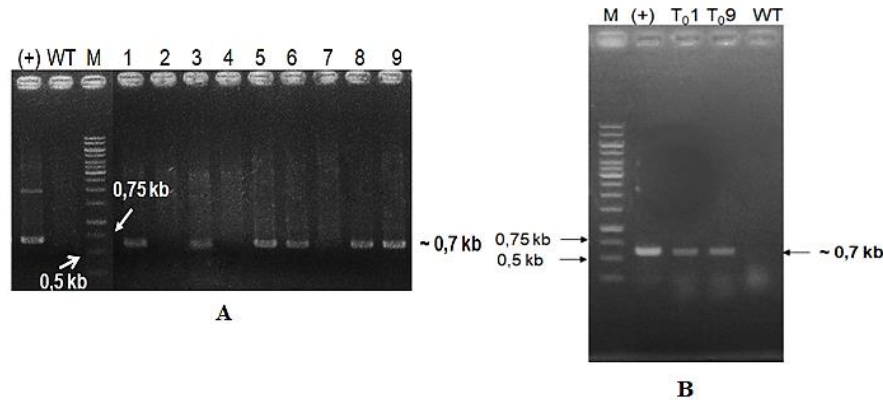
Bảng 2. Kết quả biến nạp cấu trúc *pBI121-GmDREB6* vào thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng	Số mẫu biến nạp	Số mẫu sống tạo cụm chồi	Số chồi được tái sinh	Số cây ra rễ	Số cây trồng trong nhà lưới
ĐC1*	35	0	0	0	0
ĐC0*	35	27	95	83	20
Thí nghiệm	Lần 1	35	30	83	65
	Lần 2	35	33	95	72
	Lần 3	35	32	87	69
Tổng thí nghiệm	105	95	265	206	60

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

3.2. Phân tích sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trên cây thuốc lá được biến nạp

Các cây thuốc lá biến nạp gen *GmDREB6* sau khi trồng trong nhà lưới được 4 tuần, chọn ngẫu nhiên 9 cây sinh trưởng, phát triển bình thường đem phân tích sự hiện diện của gen chuyển *GmDREB6* trên cây thuốc lá biến nạp. DNA tổng số tách chiết từ lá non của 9 cây đã chọn sử dụng cho PCR với cặp mồi *GmDREB6-F/GmDREB6-R* kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt và sự phiên mã của gen chuyển *GmDREB6* trên các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T_0 và cây WT. **(A):** (+): Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*; WT: Cây thuốc lá không biến nạp; M: thang DNA 1 kb; 1-9: Các cây thuốc lá chuyển gen T_0 . **(B):** M: thang DNA 1 kb; (+): Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB6*; T_01 và T_09 : hai dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6*; WT: Cây thuốc lá không biến nạp

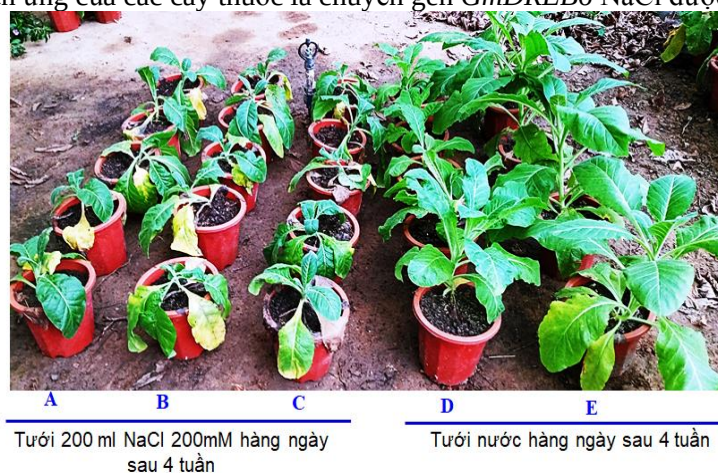
Kết quả ở hình 3A cho thấy, trong 9 cây thuốc lá được biến nạp đem phân tích có 6 cây dương tính với PCR, băng DNA có kích thước khoảng 0,7 kb xuất hiện ở các cây số 1, 3, 5, 6, 8, 9. Tiến hành thu lá non từ hai dòng cây T_01 và T_09 dương tính với PCR để tách chiết RNA tổng số, tạo cDNA và phân tích biểu hiện gen *GmDREB6* thông qua quá trình phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi *GmDREB6-F/GmDREB6-R*, kết quả thu được băng DNA có kích thước khoảng 0,7 kb tương ứng với kích thước gen *GmDREB6* (Hình 3B). Như vậy, gen chuyển *GmDREB6* đã được hợp nhất vào hệ gen của hai dòng thuốc lá chuyển gen T_01 và T_09 và quá trình phiên mã

của gen *GmDREB6* đã được thực hiện. Hai cây chuyển gen T_0 được nhân lên trong môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo hai dòng chuyển gen T_{01} và T_{09} .

3.3. Phân tích sự biểu hiện của gen *GmDREB6* trên cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* dưới điều kiện stress mặn bằng kỹ thuật Real time qRT-PCR

3.3.1. Kết quả xử lý mặn nhân tạo

Hai dòng chuyển gen T_{01} , T_{09} và các cây WT được trồng trong chậu kích thước 115 x 85 x 105 mm có chứa 3 kg đất và phân bón đã được xử lý sạch, mỗi lô thí nghiệm 10 cây. Các chậu được đặt trong nhà lưới có mái che. Sau khi cây được 4-5 lá thật tiến hành xử lý mặn nhân tạo và theo dõi sự biểu hiện kiểu hình. Ở lô thí nghiệm và đối chứng đều gồm các cây WT và hai dòng chuyển gen T_{01} và T_{09} được tưới liên tục dung dịch NaCl; còn ở lô đối chứng tưới H_2O . Thời gian tưới vào lúc 8h sáng hàng ngày với thể tích là 200 ml NaCl và 200 ml H_2O cho mỗi cây. Kết quả biểu hiện phản ứng của các cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* NaCl được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Hình thái của các cây chuyển gen và cây WT sau 4 tuần trong điều kiện xử lý bởi NaCl 200 mM và nước.
A: Cây WT; B: Dòng chuyển gen T_{01} ; C: Dòng chuyển gen T_{09} ; D: Dòng chuyển gen T_{01} và T_{09} ; E: Cây WT

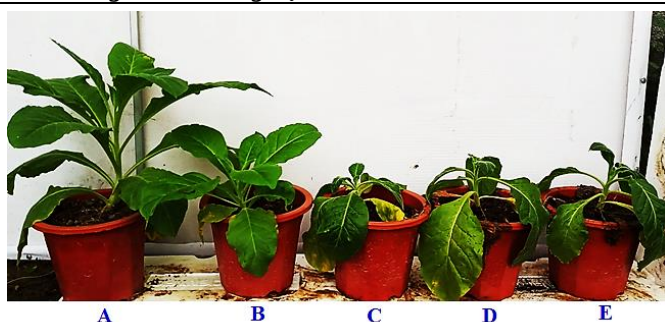
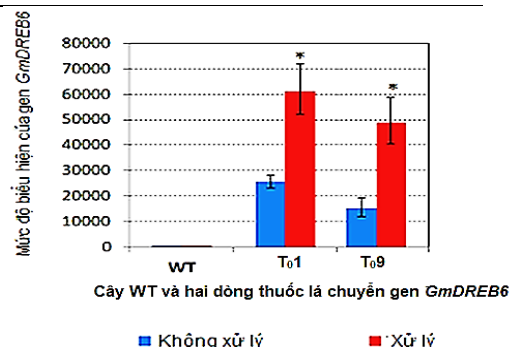
Kết quả thống kê biểu hiện phản ứng với NaCl và H_2O của các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* và các cây WT cho thấy, sau 4 tuần 100% cây không biến nạp tưới muối bị héo; ở các lô thí nghiệm, cây chuyển gen có tỷ lệ cây héo là 70% - 80%. Các cây tưới nước tỷ lệ héo 0%. Kết quả này cho thấy, các cây chuyển gen *GmDREB6* có khả năng chống chịu với stress mặn tốt hơn cây WT (Bảng 3).

3.3.2. Phân tích mức độ biểu hiện *GmDREB6* và gen *CLC* trên cây thuốc lá chuyển gen bằng kỹ thuật real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Các quan sát hình thái của các dòng thuốc lá chuyển gen và cây WT cũng cho thấy sự phát triển bình thường của các dòng thuốc lá chuyển gen khi bị stress mặn, trong khi các cây WT bị vàng lá và ngừng phát triển. Hai dòng thuốc lá chuyển gen T_{01} và T_{09} tiếp tục phân tích Real time qRT-PCR để đánh giá mức độ biểu hiện và xác định vai trò của gen *GmDREB6* từ đầu tương đối với khả năng chịu stress mặn của cây thuốc lá. Trong điều kiện bình thường, gen chuyển *GmDREB6* của các dòng chuyển gen được biểu hiện ở mức độ cao, trong khi không quan sát thấy sự biểu hiện ở cây WT. Trong điều kiện xử lý mặn, mức độ biểu hiện gen *GmDREB6* trong các dòng thuốc lá chuyển gen tăng lên so với trong điều kiện bình thường (Hình 6). Hai dòng chuyển gen T_{01} và T_{09} có mức độ phiên mã của gen *GmDREB6* tăng 2,40 lần (T_{01}) lên 3,22 lần (T_{09}) so với điều kiện không xử lý mặn bởi NaCl ($P < 0,05$). Kết quả này chỉ ra rằng, sự biểu hiện của gen *GmDREB6* liên quan trực tiếp đến khả năng phản ứng và chống chịu stress mặn của cây thuốc lá.

Bảng 3. Sự phản ứng của các cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* với 200 ml NaCl 200 mM hằng ngày trong 4 tuần

Thí nghiệm và đối chứng	Số cây thí nghiệm	Số cây héo sau 4 tuần	
		Số lượng	%
Cây WT tưới H ₂ O	10	0	0
Cây chuyển gen tưới H ₂ O	10	0	0
Cây WT tưới NaCl	10	10	100
Cây chuyển gen tưới NaCl	Lô TN 1	10	8
	Lô TN 2	10	7
	Lô TN 3	10	8
	Lô TN 4	10	8
	Lô TN 5	10	8
Tổng các lô thí nghiệm	50	39	78

**Hình 5.** Hình ảnh các dòng thuốc lá chuyển gen *GmDREB6* và cây WT trong điều kiện xử lý NaCl trong 4 tuần. A: Cây WT tưới nước; B: Cây chuyển gen T_0 tưới nước; C: Cây WT tưới 200 ml NaCl 200 mM hằng ngày trong vòng 4 tuần; D, E: Cây chuyển gen T_{01} và T_{09} tưới 200 ml NaCl 200 mM hằng ngày trong vòng 4 tuần**Hình 6.** Phân tích mức độ biểu hiện của gen *GmDREB6* ở hai dòng thuốc lá chuyển gen trong điều kiện xử lý bởi NaCl bằng qRT-PCR; WT: cây thuốc lá không biến nạp; T_{01} và T_{09} : hai dòng thuốc lá chuyển gen. Dấu (*) trên mỗi cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với cây WT

4. Kết luận

Cấu trúc mang gen *GmDREB6* đã được biến nạp thành công vào mô lá của giống thuốc lá K326 thông qua *A. tumefaciens* và tạo được hai dòng cây thuốc lá chuyển gen ở giai đoạn phân tích PCR, RT-PCR, qRT-PCR. Trong điều kiện stress mặn, mức độ phiên mã của gen *GmDREB6* ở hai dòng thuốc lá chuyển gen T_{01} và T_{09} tăng từ 2,40 lần (ở dòng T_{01}) lên 3,22 lần (ở dòng T_{09}) so với điều kiện không xử lý mặn bởi NaCl. Gen *GmDREB6* có thể là một ứng cử viên tiềm năng để sử dụng trong cải thiện khả năng chịu mặn của cây trồng, mở ra hướng nghiên cứu phát triển cây trồng chịu mặn trong bối cảnh biến đổi khí hậu và nước biển dâng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp Bộ mã số B2021-TNA-18. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] P. Shrivastava and R. Kumar, "Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, pp. 123-131, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>.
- [2] N. S. Muchate, G. C. Nikalje, N. S. Rajurkar, P. Suprasanna, and T. D. Nikam, "Plant salt stress: Adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance," *Bot. Rev.*, vol. 82, pp. 371-406, 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s12229-016-9173-y>.

- [3] B. Gupta and B. Huang, "Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization," *International Journal of Genomics*, vol. 2014, 2014, Art. no. 701596, doi: <https://doi.org/10.1155/2014/701596>.
- [4] K. Shu, Y. Qi, F. Chen, Y. Meng, X. Luo, H. Shuai, W. Zhou, J. Ding, J. Du, J. Liu, F. Yang, Q. Wang, W. Liu, T. Yong, X. Wang, Y. Feng, and W. Yang, "Salt stress represses soybean seed germination by negatively regulating ga biosynthesis while positively mediating aba biosynthesis," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, 2017, Art. no. 1372, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01372>.
- [5] S. Rehman, G. Abbas, M. Shahid, M. Saqib, A. B. U. Farooq, M. Hussain, B. Murtaza, M. Amjad, M.A. Naeem, and A. Farooq, "Effect of salinity on cadmium tolerance, ionic homeostasis and oxidative stress responses in conocarpus exposed to cadmium stress: Implications for phytoremediation," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 171, pp. 146-153, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.077>.
- [6] P. Ahmad, M. A. Ahanger, P. Alam, M. N. Alyemeni, L. Wijaya, S. Ali, and M. Ashraf, "Silicon (si) supplementation alleviates nacl toxicity in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] through the modifications of physio-biochemical attributes and key antioxidant enzymes," *J. Plant Growth Reg.*, vol. 38, pp. 70-82, 2019, doi: 10.1007/s00344-018-9810-2.
- [7] S. Jan, M. N. Alyemeni, L. Wijaya, P. Alam, K. H. Siddique, and P. Ahmad, "Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates cadmium stress via the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems and macronutrient content in pisum sativum l. Seedlings," *BMC Plant Biol.*, vol. 18, 2018, Art. no. 146, doi: 10.1186/s12870-018-1359-5.
- [8] M. Hussain, H. W. Park, M. Farooq, H. Jabran, and D. J. Lee, "Morphological and physiological basis of salt resistance in different rice genotypes," *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 15, pp. 113-118, 2013.
- [9] S. Schubert, A. Neubert, A. Schierholt, A. Sumer, and C. Zorb, "Development of salt resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods," *Plant. Sci.*, vol. 177, pp. 196-202, 2009, doi: 10.1016/j.plantsci.2009.05.011.
- [10] M. N. Uddin, S. Hanstein, R. Leubner, and S. Schubert, "Leaf cell-wall components as influenced in the first phase of salt stress in three maize (zea mays l.) hybrids differing in salt resistance," *J. Agron. Crop Sci.*, vol. 199, pp. 405-415, 2013, doi: <https://doi.org/10.1111/jac.12031>.
- [11] R. Serraj and T. R. Sinclair, "Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions," *Plant Cell Environ.*, vol. 25, pp. 333-341, 2002, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00754.x>.
- [12] C. Kaya, A. L. Tuna, and A. M. Okant, "Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions," *Turk. J. Agric. For.*, vol. 34, pp. 529-538, 2010, doi: 10.3906/tar-0906-173.
- [13] S. P. Kashyap, H. C. Prasanna, K. Nishi, M. Pallavi, and B. Singh, "Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and de novo assembly of wild tomato solanum chilense," *Scientific Reports*, vol. 10, 2020, Art. no. 15835, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72474-w>.
- [14] T. Nolan, R. E. Hands, and S. A. Bustin, "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR," *Nature Protocols*, vol. 1, pp.1559-1582, 2006.
- [15] X. X. Zhang, Y. J. Tang, Q. B. Ma, C. Y. Yang, Y. H. Mu, H. C. Suo, L. H. Luo, and H. Nian, "OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean," *PLoS One*, vol. 8, 2013, Art. no. e83011, doi: 10.1371/journal.pone.0083011.
- [16] T. N. L. Nguyen, P. Vaciana, T. C. Nguyen, H. Q. Nguyen, T. T. N. Pham, T. T. T. Vu, and H. M. Chu, "Characteristics and phylogeny of DREB gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Meril]," *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering (VJSTE)*, vol. 63, pp. 60-64, 2021.
- [17] M. Chen, Q. Y. Wang, Z. S. Xu, L. C. Li, X. G. Ye, L. Q. Xia, and Y. Z. Ma, "GmDREB2, a soybean DRE - binding transcription factor, conferred drought and high - salt tolerance in transgenic plants," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 353, pp. 299-305, 2007.
- [18] X. T. Dao, M. T. Ho, T. T. T. Vu, V. S. Le, and H. M. Chu, "Cloning and overexpression of GmDREB2 gene from a vietnamese drought-resistant soybean variety," *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 58, pp. 651-657, 2015, doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050170>.
- [19] T. T. N. Pham, H. Q. Nguyen, T. N. L. Nguyen, X. T. Dao, D. T. Sy, V. S. Le, and H. M. Chu, "Overexpression of the GmDREB2 gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants," *Australian Journal of Crop Science*, vol. 14, pp. 495-503, 2020.
- [20] Y. Z. Ma, Y. W. Liu, M. Chen, Z. S. Xu, L. C. Li, and G. Y. Zh, "*Glycine max* dehydration responsive

- element binding protein 6 mRNA,” *GenBank*: EF551166.1, 2007.
- [21] H. Q. Nguyen, T. K. L. Vu, T. N. L. Nguyen, T. T. N. Pham, T. H. Y. Nguyen, V. S. Le, and H. M. Chu, “Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants,” *Scientific Reports*, vol. 9, 2019, Art. no. 19663, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55895-0>.
- [22] J. F. Topping, “Tobacco transformation,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 81, pp. 365-372, 1998.
- [23] M. A. Saghai-Marooof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, “Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 81, pp. 8014-8018, 1984, doi: 10.1073/pnas.81.24.8014.
- [24] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T},” *Methods*, vol. 25, pp. 402-408, 2001.