

GENERATING GENE EXPRESSION CONSTRUCT AND AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF *GmDREB7A* IN TOBACCO

Tu Quang Tan^{1*}, Bui Thi Minh Thuy¹, Vanhsy Sysouphanh¹
 Nguyen Thi Hai Yen², Nguyen Thi Ngoc Lan¹, Chu Hoang Mau¹

¹TNU - University of Education, ²TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 28/5/2022	Soybean is a seed crop with high economic and nutritional value and a soil improvement crop that poorly tolerates drought and salinity. In the soybean genome, the <i>DREB</i> gene group has been identified as activating transcription of stress-resistance genes, including some genes of unknown function, and <i>DREB7</i> is one of them. In this study, the <i>GmDREB7A</i> gene and its expression construct were designed and successfully transformed into tobacco. Gene <i>GmDREB7A</i> includes an amino acid coding sequence, a c-myc coding segment, KDEL, and an additional short nucleotide at the 5', and 3' ends containing the restriction enzyme's cut-off point. Two transgenic constructs pBI121_ <i>GmDREB7A</i> and pZY_ <i>GmDREB7A</i> have been successfully designed. The results of structural transformation pBI121_ <i>GmDREB7A</i> carrying the <i>GmDREB7A</i> gene into tobacco plants produced 248 transgenic plants after selection with kanamycin, and 30 plants under greenhouse conditions with nine plants were positive for PCR. It is necessary to continue to analyze the T0 transgenic tobacco plants that are positive for PCR and evaluate the tolerance to drought and salinity stress of the <i>GmDREB7A</i> transgenic plants.
Revised: 14/6/2022	
Published: 14/6/2022	
KEYWORDS	
Drought resistance	
<i>GmDREB7A</i> gene	
Gene expression construct	
Salt resistance	
Transgenic tobacco	

TẠO CẤU TRÚC BIỂU HIỆN VÀ BIẾN NẠP GENE *GmDREB7A* THÔNG QUA *AGROBACTERIUM* Ở THUỐC LÁ

Tu Quang Tân^{1*}, Bùi Thị Minh Thúy¹, Vanhsy Sysouphanh¹
 Nguyễn Thị Hải Yến², Nguyễn Thị Ngọc Lan¹, Chu Hoàng Mậu¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 28/5/2022	Đậu tương, loại cây trồng thu hạt có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao và là cây cải tạo đất trồng, nhưng có khả năng chịu hạn, mặn kém. Trong hệ gen đậu tương, nhóm gen <i>DREB</i> được xác định có chức năng kích hoạt phiên mã của các gene chống chịu khi có tín hiệu stress, trong đó có một số gene chưa rõ chức năng cụ thể và <i>DREB7</i> là một gene trong số đó. Trong bài báo này, gene <i>GmDREB7A</i> và cấu trúc biểu hiện mang gen này được tạo ra và biến nạp thành công vào thuốc lá. Gene <i>GmDREB7A</i> gồm đoạn mã hóa amino acid, đoạn mã hóa c-MYC, KDEL và thêm đoạn nucleotide ngắn ở đầu 5' và 3' chứa điểm cắt của enzyme giới hạn. Hai cấu trúc chuyển gen pBI121_ <i>GmDREB7A</i> và pZY_ <i>GmDREB7A</i> đã được thiết kế thành công. Kết quả biến nạp cấu trúc pBI121_ <i>GmDREB7A</i> mang gene <i>GmDREB7A</i> vào thuốc lá đã thu được 248 cây biến nạp sau giai đoạn chọn lọc bằng kanamycin và 30 cây được trồng trong điều kiện nhà lưới với 9 cây dương tính với PCR. Cần tiếp tục phân tích các cây thuốc lá chuyển gen T0 dương tính với PCR và đánh giá khả năng chống chịu các stress hạn, mặn của các cây chuyển gen <i>GmDREB7A</i> .
Ngày hoàn thiện: 14/6/2022	
Ngày đăng: 14/6/2022	
TỪ KHÓA	
Kháng hạn	
Gene <i>GmDREB7A</i>	
Cấu trúc biểu hiện gene	
Kháng muối	
Thuốc lá chuyển gen	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6066>

* Corresponding author. Email: tantq@tmue.edu.vn

1. Giới thiệu

Đậu tương là cây nông nghiệp, cây thực phẩm và cây cải tạo đất [1]. Tuy nhiên, cây đậu tương rất nhạy cảm với các tác động bất lợi sinh học và phi sinh học, trong đó có hạn và mặn [2]. Các stress hạn, mặn đã gây hậu quả nghiêm trọng về năng suất và chất lượng hạt đậu tương, chính vì vậy, nghiên cứu nâng cao khả năng chống chịu hạn, mặn đối với cây đậu tương là định hướng cũng như giải pháp ứng phó với tình hình biến đổi khí hậu hiện nay.

Tính kháng các yếu tố bất lợi biotic và abiotic của đậu tương là tính trạng đa gen và liên quan đến sản phẩm biểu hiện của nhiều gen. Hai nhóm gen trong hệ gen cây đậu tương liên quan đến tính chống chịu các yếu tố abiotic gồm các gen mà sản phẩm của chúng liên quan trực tiếp đến tính chống chịu và các gen mà sản phẩm của nó kích hoạt hoặc ức chế sự biểu hiện của các gen chức năng. Trong số các gen điều hòa có nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã (transcription factor: TF) như *DREB*, *MYB*, *MYC*, *NAC*... [2]. *DREB* (Dehydration responsive element binding) thuộc họ nhân tố phiên mã AP2/ERF có vai trò kích hoạt sự phiên mã của nhóm gen chống chịu ở thực vật khi có tín hiệu stress abiotic từ ngoại cảnh [3]. Các gen mục tiêu được kích hoạt phiên mã mạnh bởi sự liên kết giữa *DREB* - nhân tố trans với trình tự *cis* của promoter khi có tín hiệu stress từ ngoại cảnh [4]. Phân họ gen *DREB* ở đậu tương có nhiều thành viên, trong số đó một vài gen trong phân họ gen *DREB* ở cây đậu tương chưa được nghiên cứu và phân tích biểu hiện protein tái tổ hợp cũng như xác định chức năng sinh học của chúng [5]. Mặc dù hệ gen đậu tương đã được giải mã, tuy nhiên còn rất nhiều gen còn chưa được biết rõ cấu trúc cũng như chức năng của chúng. Một nghiên cứu gần đây cho thấy trong hệ gen đậu tương có tới 18 gen thuộc phân họ *DREB* [5] và có nhiều gen cần làm sáng tỏ vai trò của chúng với khả năng chống chịu các stress phi sinh học, trong số các gen đó có gen *DREB7* mang mã số NM_001248108.2 trên GenBank [6]. Gen *DREB7* (Gene ID: 100101894) của đậu tương có vị trí trên nhiễm sắc thể số 20 [7] là một gen giả định, chưa rõ chức năng.

Trong các công bố trước, nhóm nghiên cứu đã làm sáng tỏ chức năng của gen *GmDREB2*, *GmDREB6* [4], [8], [9] và các nghiên cứu tiếp theo, chức năng của gen *GmDREB7A* trong hệ gen đậu tương được tiếp tục chứng minh bằng thực nghiệm. Bài báo này đề cập đến kết quả thiết kế gen và vector biểu hiện mang gen *GmDREB7A* phục vụ nghiên cứu chức năng của *GmDREB7A* trong hệ gen đậu tương thông qua kỹ thuật chuyển gen.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vector tách dòng *pJET1.2* và vector biểu hiện gen thực vật như *pBI121*, *pZY102*. Giống thuốc lá K326 *in vitro* và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 được lưu giữ tại Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

PCR sử dụng xác nhận gen *GmDREB7A* trong khuẩn lạc *E. coli*, *A. tumefaciens* và phân tích cây chuyển gen. Trình tự nucleotide của các môi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các môi PCR

Môi	Trình tự nucleotide (5' 3')	Kích thước dự kiến (kb)
GmDR-F/Cmyc-Kdel-R	ATGTTTTCCATCAATCATTTCTCC AAGTTCATCCTTCAGGTCCTC	0,67
RB-F	ACCCGCCAATATATCCTGTC	0,8
35S-F	AGCGGATAACAATTTACACAGG	0,6
pUC18-R	AGCGGATAACAATTTACACAGG	0,9

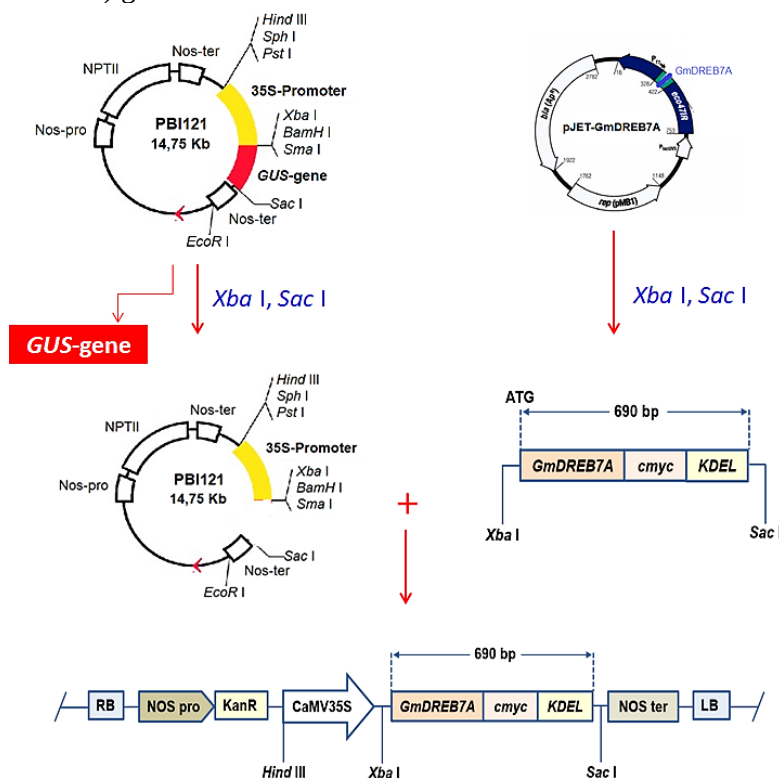
2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế gene và cấu trúc biểu hiện gene

Gen *GmDREB7A* nhân tạo được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen *DREB7A* của đậu tương mang mã số NM_001248108.2 trên GenBank [6]. Gen *GmDREB7A* gồm đoạn mã hóa

amino acid, đoạn mã hóa c-MYC, KDEL và thêm 12 nucleotide (ACTAGAGGATCC) ở đầu 5' là vị trí cắt của enzyme *Xba* I và *Bam*HI, thêm 6 nucleotide (GAGCTC) ở đầu 3' là vị trí cắt của *Sac* I, thêm 6 nucleotide (CCCGGG) là vị trí cắt của *Xma*I. Gen *GmDREB7A* được gắn trong vector tách dòng *pJET1.2* (*pJET1.2_GmDREB7A*).

Thiết kế vector biểu hiện gen thực vật *pBI121* mang gen chuyển *GmDREB7A* (*pBI121_GmDREB7A*) gồm các bước cơ bản như sơ đồ ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế cấu trúc chuyển gen *pBI121_GmDREB7A*

Bằng phương pháp tương tự, vector chuyển gen *pZY_GmDREB7A* chứa gen kháng phosphinothricin được tạo ra từ vector *pBI121_GmDREB7A*. Biến nạp *pBI121_GmDREB7A* và *pZY_GmDREB7A* vào *A. tumefaciens* AGL1 tạo vi khuẩn tái tổ hợp. Kiểm tra khuẩn lạc biến nạp bằng colony-PCR.

2.2.2. Biến nạp di truyền gen *GmDREB7A* vào thuốc lá và tạo cây chuyển gene *T0*

Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene *GmDREB7A* vào thuốc lá được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) [10]. Tách chiết DNA tổng số từ lá thuốc lá được tiến hành theo Saghai-Marooof và cộng sự (1984) [11]. PCR nhân đoạn gene *GmDREB7A* với cặp mồi *GmDR-F/Cmyc-Kdel-R*. Thành phần PCR gồm 7,5 μ l Master mix 2X, 0,5 μ l primer F (10 pM), 0,5 μ l primer R (10 pM) và 15 μ l H₂O. Chu trình nhiệt của PCR gồm 94°C trong 3 phút; lặp lại 27 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 55°C – 30 giây và 72°C – 1 phút. Kết thúc ở 72°C – 5 phút.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thiết kế và tổng hợp gen *GmDREB7A* nhân tạo

Gen *GmDREB7A* nhân tạo được thiết kế dựa trên cơ sở thông tin về gen *GmDREB7A* của đậu tương mang mã số NM_001248108.2 trên GenBank gồm 624 nucleotide mã hóa amino acid, bổ sung 12 nucleotide (ACTAGAGGATCC) ở đầu 5' là vị trí cắt của *Xba*I/ *Bam*HI, thêm 9 nucleotide (TAAGAGCTC) ở đầu 3' là vị trí cắt của *Sac*I, 3 nucleotide (CCCGGG) để tạo vị trí

cắt của *Xma*I, thêm 30 nucleotide mã hóa đuôi cmyc, 12 nucleotide mã hóa KDEL. Tổng cộng là 690 nucleotide (Hình 2). Gen *GmDREB7A* được gắn trong vector pJET (pJET-*GmDREB7A*).

```

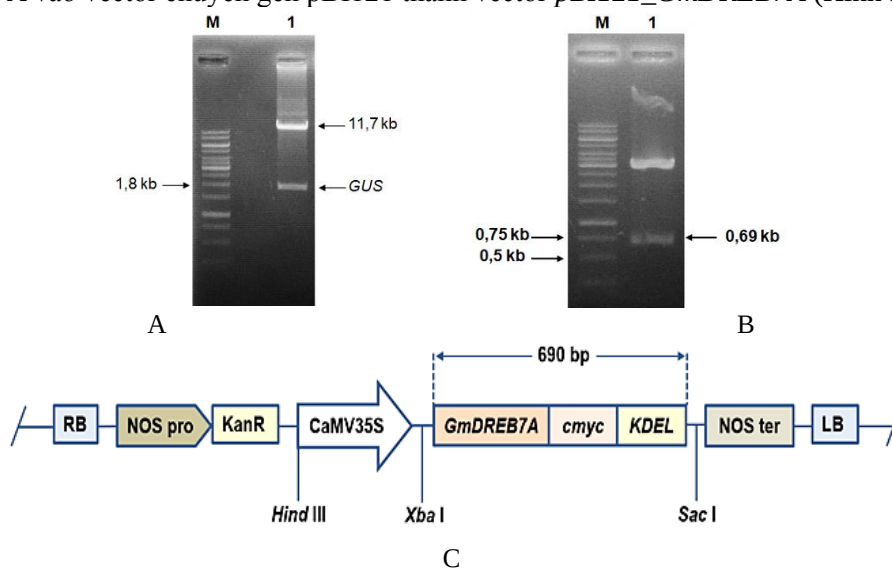
XbaI  BamHI
actagaggatccATGTTTTCATCAATCATTTCTCCGACCCAGATGCCACCTCGCCGGGGTCGG
GAGGAAGCTCCCGACCGGCGCTGTCGGACGAGGATTTTTTCTGGCGGCAAGCAATCCCAAGAA
ACGCGCCGGGAGGAAGAAGTTCCGGGAGACGCGCCACCCGGTGTACCGCGCGCTGAGAAGGCGG
GACTCCGGCAAGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGAGCCCCAACAAGAAGTCCAGGATTTGGCTCGGGA
CCTTTCCACGGCGGAGATGGCGGCGCGTGCATGACGTGGCGGCGATCGCGCTGAGGGGAAG
GTCAGCCTGCCTCAACTTCGCCGACTCCGCGTCTCGGCTCCCGGTGCCGGCGACGGCGGAGGCC
AGGGACATTGAGAAGGCTGCGGCGGAGGCCGAGAGGCGTTTCGCCCTGGGAAGGATGATGATG
CGGTGGCGGAGAGGGTGGCAGCGACGGCGACGGAGCGTGAAGAAGAACAAGAAGAAGGGATGGT
GCCGGAGTATCTGAGGAACATGGTGCTCATGTGCGCCGACGCATTGCTTCGGGAGTGATGAGTAT
GGAAGTGCTGACGTGGAATTTGACGATGCTGAAGTTTCTCTGTGGAGTTACTCCATTcccggg
GAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGAAGGATGAACCTTAAgagctcXmaI
      cmyc           KDEL           Sac I

```

Hình 2. Trình tự đoạn gen *GmDREB7A* nhân tạo có 690 nucleotide chứa trình tự c-myc và KDEL. Ở đầu 5' là vị trí cắt của enzyme *Xba*I và *Bam*H I; ở đầu 3' là vị trí cắt của enzyme *Sac* I

3.2. Tạo vector biểu hiện gen mang cấu trúc chứa gen *GmDREB7A*

Tạo vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7A* được thực hiện theo sơ đồ đã trình bày ở hình 2. Tiến hành thí nghiệm loại gen *GUS* khỏi vector *pBI121_GUS* bằng cặp enzyme *Xba* I/ *Sac* I (Hình 3A). Đồng thời tiến hành thí nghiệm cắt vector *pJET_GmDREB7A* bằng cặp enzyme *Xba* I/ *Sac* I để thu nhận gen *GmDREB7A* (Hình 3B). Sử dụng enzyme nối T4-DNA ligase nối gen *GmDREB7A* vào vector chuyển gen *pBI121* thành vector *pBI121_GmDREB7A* (Hình 3C).

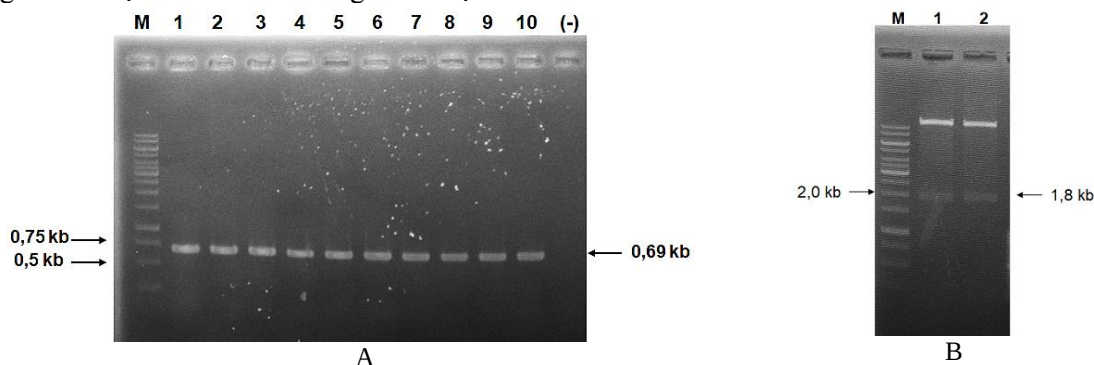


Hình 3. Điện di đồ kiểm tra kết quả xử lý vector bằng enzyme giới hạn và sơ đồ vector biểu hiện gene thực vật *pBI121_GmDREB7A*. **A:** Điện di đồ kiểm tra sản phẩm cắt vector *pBI121* bằng cặp enzyme *Sac* I và *Xba* I. **B:** Điện di đồ kiểm tra sản phẩm cắt vector *pJET_GmDREB7A* bằng cặp enzyme *Sac* I và *Xba* I. **M:** thang DNA 1 kb. **C:** Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện gene thực vật *pBI121_GmDREB7A*. LB: left T-DNA border; RB: right T-DNA border; KanR: gen kháng kanamycin.; CaMV35S: promoter 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ; Gen *GmDREB7A* có 690 bp

Vector biểu hiện gene thực vật *pBI121_GmDREB7A* có cấu trúc bao gồm một số thành phần chính như đoạn left T-DNA border và right T-DNA border, vùng gen kháng kanamycin; vùng promoter 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, gen *GmDREB7A* gắn đuôi cmyc và KDEL gồm 690 bp, một số vị trí cắt của enzyme giới hạn (Hình 3C). Vector *pBI121_GmDREB7A* chứa

vùng gen kháng kháng sinh kanamycin, vì thế kanamycin được sử dụng làm chất chọn lọc các cây chuyển gen *in vitro*.

Biếp nạp vector *pBI121_GmDREB7A* vào *E. coli*, nhân dòng và lấy ngẫu nhiên 10 khuẩn lạc kiểm tra bằng colony-PCR với cặp mồi GmDR-F/Cmyc-Kdel-R, kết quả thu được băng DNA có kích thước khoảng 0,69 kb, chính là kích thước của vùng gen *GmDREB7A_cmyc_KDEL* (Hình 4A). Tiến hành nuôi lỏng và tách plasmid từ khuẩn lạc số 1, 2. Kiểm tra vector mới thiết kế bằng enzyme *Hind* III và *Eco*R I, kết quả thu được băng DNA có kích thước khoảng 1,8 kb chứa gen *GmDREB7A* (Hình 4B). Vector *pBI121-GmDREB7A* chứa gen *GmDREB7A* được xác nhận bằng giải trình tự nucleotide từ dòng khuẩn lạc số 1 với mồi 35S-F và GmDR-F.



Hình 4. A: Điện di đồ kiểm tra sản phẩm colony-PCR từ các dòng khuẩn lạc. M: thang DNA 1 kb; 1-10: sản phẩm colony-PCR phân tích gen *GmDREB7A*; (-): Đối chứng âm là dòng *E. coli* không biến nạp.

B: Điện di đồ kiểm tra sản phẩm cắt vector *pBI121-GmDREB7A* bằng *Hind* III và *Eco*R I

Bằng phương pháp và kỹ thuật tương tự, từ vector *pBI121_GmDREB7A*, xử lý bằng hai enzyme *Hind* III và *Eco*R I thu cấu trúc chứa gene *GmDREB7A* có kích thước 1,8 kb; cắt vector *pZY102* thu cấu trúc *pZY* có kích thước 8,9 kb. Sử dụng enzyme nối T4 DNA ligase nối cấu trúc mang gene *GmDREB7A* vào vector chuyển gen *pZY102* thành vector *pZY_GmDREB7A*

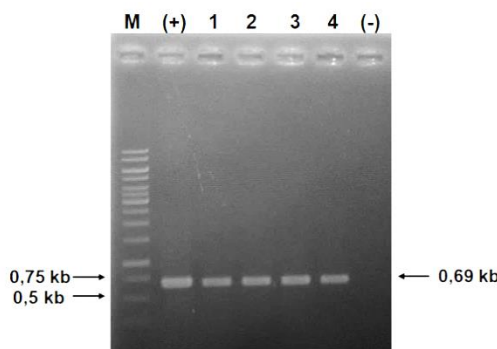
3.3. Tạo vi khuẩn *A.tumefaciens* AGL1 chứa vector biểu hiện mang gene *GmDREB7A*

Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7A* được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* AGL1. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *GmDREB7A* trong bốn dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng colony-PCR thu được đoạn DNA có kích thước khoảng 0,69 kb tương ứng với kích thước của gene *GmDREB7A* (Hình 5). Như vậy, chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang gen *GmDREB7A* có thể sử dụng trong biến nạp vào mô thực vật để tạo cây chuyển gen.

Bằng các kỹ thuật tương tự, vector biểu gene *pZY_GmDREB7A* được biến nạp thành công vào *A.tumefaciens* AGL1 và tạo được các dòng *A.tumefaciens* chứa vector biểu hiện mang gene *GmDREB7A*. Vector biểu hiện gene thực vật *pZY_GmDREB7A* chứa gene kháng phosphinothricin. Vì vậy trong quá trình chọn lọc chồi và cây chuyển gene *in vitro*, phosphinothricin được sử dụng làm chất chọn lọc. Ưu điểm của vector này là trong môi trường nuôi cấy không chứa kháng sinh.

3.4. Kết quả chuyển cấu trúc mang gen *GmDREB7A* vào mô lá thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* và tạo cây thuốc lá chuyển gen

Lá bánh tẻ từ cây thuốc lá *in vitro* được cắt thành những mảnh có kích thước 1 cm² và đặt cảm ứng lên môi trường MS (MS cơ bản, 1 mg/l BAP, 30 g/l glucose, 8 g/l agar, pH = 5,8) 2 ngày trước khi biến nạp. Các mảnh lá được lây nhiễm bởi *Agrobacterium* (OD₆₀₀=0,8) chứa cấu trúc chuyển gen trong 30 phút, sau đó thấm khô và chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy 150 ml (MS+ BAP – 1 mg/l) + 300 µl AS và để trong tối 2 ngày.

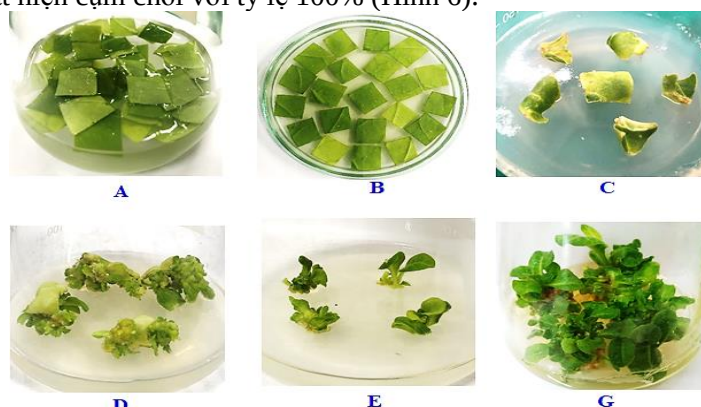


Hình 5. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm clony-PCR từ các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens*. M: thang DNA 1 kb; (+): Đối chứng dương là plasmid pBI121 GmDREB7A; 1-4: sản phẩm clony-PCR gene GmDREB7A từ 4 dòng khuẩn lạc; (-): Đối chứng âm là *A. tumefaciens* không biến nạp

Sau 2 ngày, ngâm rửa các mảnh lá biến nạp 10 phút trong dung dịch 1/2 MS + cefotaxim (400 mg/l), thấm khô 2 mặt mảnh lá, chuyển sang môi trường 150 ml (MS + BAP – 1 mg/l) bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l, cefotaxim 400 mg/l để tái sinh tạo đa chồi. Do vector chuyển gen có mang đoạn gen kháng kanamycin, nên các môi trường sau biến nạp đều được bổ sung kanamycin 50 mg/l để chọn lọc các cụm chồi chuyển gen. Bổ sung cefotaxim 400 mg/l vào môi trường nhằm loại bỏ vi khuẩn còn sót lại trên các mảnh lá.

Thí nghiệm chuyển gen *GmDREB7A* vào cây thuốc lá K326 được lặp lại 3 lần, mỗi lần với 30 mảnh lá nguyên liệu. Sau 10 ngày mảnh lá có màu vàng xanh, tại những vết cắt ở các mảnh lá xuất hiện những cụm tế bào cứng, có màu xanh trắng và mảnh lá có màu vàng xanh. Song song với thí nghiệm chuyển gen, thí nghiệm đối chứng được thiết lập bằng cách đặt 30 mảnh lá thuốc lá K326 trực tiếp lên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh (ĐC0) và 30 mảnh lá thuốc lá lên môi trường MS có bổ sung kháng sinh (ĐC1). Toàn bộ mảnh lá không chuyển gen được đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh đều vàng dần chuyển sang trắng và chết. Những mảnh lá được đặt trên môi trường tái sinh không có kháng sinh thì tạo mô sẹo. Kết quả trong 3 lần biến nạp, với 90 mẫu biến nạp thì có 84 mảnh lá sống sót trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh. Ở lô ĐC1, cả 30 mẫu đều bị chết ở môi trường chọn lọc, trong khi ĐC0 cả 30 mẫu đều sống sót.

Quan sát các mảnh lá được biến nạp trên môi trường tái sinh chồi sau 2 tuần, thấy xuất hiện những cụm chồi nhỏ ở những mảnh lá. Cây chuyển cụm chồi sang môi trường bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l, cefotaxim 400 mg/l. Những mảnh lá lô đối chứng không chuyển gen đều xuất hiện cụm chồi với tỷ lệ 100% (Hình 6).



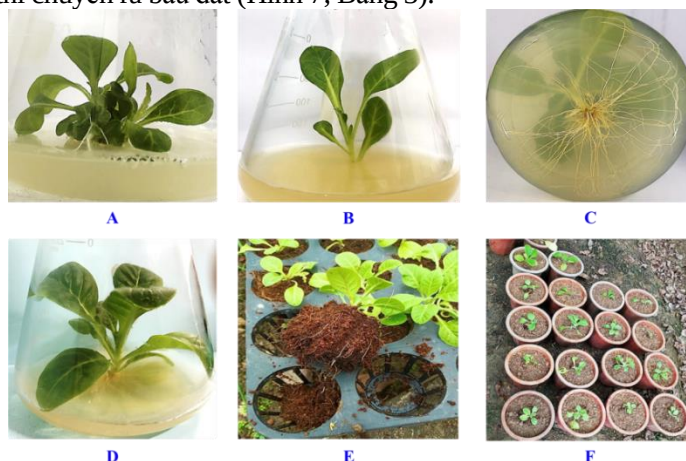
Hình 6. Hình ảnh nhiễm khuẩn, đồng nuôi cấy và tái sinh chồi biến nạp. A: Mảnh lá ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn; B: Mảnh lá trên môi trường đồng nuôi cấy; C: Mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy trên môi trường chọn lọc; D: Các cụm chồi được tạo thành sau 2 tuần được cấy trong môi trường chọn lọc; E: Cụm chồi được tách ra và cấy trên môi trường chọn lọc; G: Cụm chồi hình thành sau 4 tuần

Kết quả biến nạp gen *GmDREB7A* vào mô lá thuốc lá giống K326 cho thấy, trong 84 mảnh lá sống sót trên môi trường chọn lọc có 103 cụm chồi và tổng số chồi sống sót trong môi trường chọn lọc là 269 chồi. ĐC1 có 95 chồi sống sót. Các chồi được sinh trưởng và chuyển sang môi trường ra rễ (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả tái sinh chồi thuốc lá được chuyển gen

Thí nghiệm và đối chứng	Số mảnh lá sống sót	Số cụm chồi tạo thành	Số chồi tạo thành và sống sót
Chuyển gen	Lần 1	28	35
	Lần 2	29	37
	Lần 3	27	31
	<i>Tổng</i>	<i>84</i>	<i>103</i>
ĐC0	30	48	95

Cụm chồi sau 2 tuần tuổi có chiều cao 2–3 cm được tách nhỏ và chuyển sang môi trường tạo rễ. Sau 4 – 5 tuần rễ đã xuất hiện ở đa số các chồi và lá mới xuất hiện ở các chồi. Khi cây đạt chiều cao 5 - 7 cm thì chuyển ra bầu đất (Hình 7, Bảng 3).



Hình 7. Hình ảnh chồi thuốc lá biến nạp *in vitro* ra rễ và trồng trên giá thể. A: Cụm chồi hình thành sau 4 tuần; B: Chồi thuốc lá chuyển gen trong môi trường ra rễ (RM); C, D: Ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh; E: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trên giá thể; G: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trên bầu đất

Bảng 3. Kết quả tạo rễ và chuyển cây thuốc lá chuyển gen ra môi trường tự nhiên

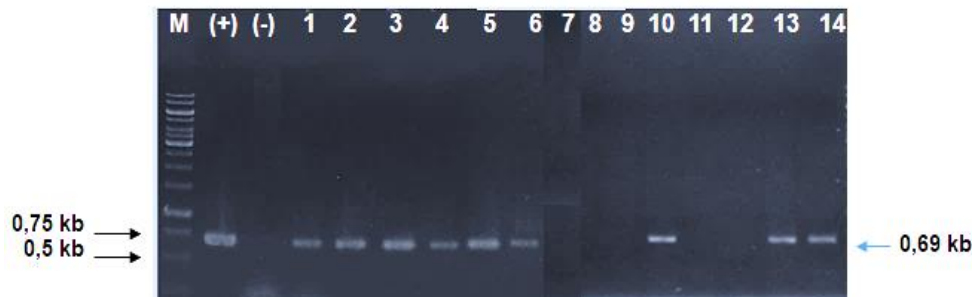
Thí nghiệm và đối chứng	Số chồi tạo thành và sống sót	Số chồi kéo dài	Số cây ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây trồng tại vườn
Chuyển gen	Lần 1	89	89	84	10
	Lần 2	96	96	86	10
	Lần 3	84	84	78	10
	<i>Tổng</i>	<i>269</i>	<i>269</i>	<i>248</i>	<i>30</i>
ĐC0	95	95	95	20	10

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, trong lô thí nghiệm chuyển gen, với 90 mảnh lá thuốc lá sử dụng làm vật liệu nhận gen thu được 269 chồi *in vitro* sống sót trên môi trường MS có bổ sung kháng sinh và 248 chồi ra rễ. Số cây ra bầu đất là 60 và đem 30 cây ra trồng tại nhà lưới. Ở lô đối chứng ĐC1 trong 30 mảnh lá có 95 chồi sống sót và ra rễ. Chuyển 20 cây ra bầu đất và 10 cây được trồng tại nhà lưới.

3.5. Phân tích sự hiện diện của gen chuyển *GmDREB7A* trong cây thuốc lá biến nạp

Tiến hành thu lá non của 14 dòng cây thuốc lá biến nạp sau 3 – 4 tuần trong nhà lưới để tách DNA. Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmDREB7A* bằng PCR với cặp mồi GmDR-F/Cmyc-

Kdel-R. Trên hình 8, trong 14 cây thuốc lá biến nạp gen *GmDREB7A* đã có 9 cây xuất hiện băng DNA có kích thước tương ứng với gen chuyển *GmDREB7A*, đó là các cây số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13, 14. Như vậy, gen chuyển *GmDREB7A* đã được biến nạp thành công vào cây thuốc lá thông qua *A.tumefaciens*.



Hình 8. Điện di đồ kết quả kiểm tra cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB7A*. M: thang DNA 1 kb; (+): Đối chứng dương là plasmid *pBI121 GmDREB7A*; (-): Đối chứng âm là cây thuốc lá không biến nạp; 1-14: Các cây thuốc lá T_0 được biến nạp

4. Kết luận

Gen *GmDREB7A* nhân tạo được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmDREB7* của đậu tương mang mã số NM_001248108.2 trên GenBank. Gen *GmDREB7A* có 690 bp gồm đoạn mã hóa của gen *GmDREB7A* (624 nucleotide), đoạn *cmv* và KDEL. Hai cấu trúc vector chuyển gen thực vật *pBI121_GmDREB7A* và *pZY_GmDREB7A* đã được thiết kế thành công, trong đó môi trường chọn lọc *in vitro* đối với vector *pBI121_GmDREB7A* là kháng sinh kanamycin và đối với vector *pZY_GmDREB7A* là phosphinothricin. Biến nạp cấu trúc *pBI121_GmDREB7A* vào mô lá thuốc lá đã tạo được 248 cây thuốc lá chuyển gen sau giai đoạn chọn lọc bằng kanamycin, trong đó có 30 cây được trồng trong điều kiện nhà lưới. Kiểm tra 14 cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T_0 đã thu được 9 cây dương tính với PCR. Cần tiếp tục phân tích các cây thuốc lá chuyển gen T_0 dương tính với PCR bằng các kỹ thuật sinh học phân tử và đánh giá khả năng chống chịu hạn, mặn của các cây chuyển gen *GmDREB7A*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên thông qua Đề tài khoa học và công nghệ cấp sở, mã số TNUE-2022-16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. D. Ngo, D. L. Tran, V. L. Tran, D. T. Do, and T. D. Pham, *Soybean plant*. Hanoi Agricultural Publishing House, 1999.
- [2] H. M. Chu, T. T. H. Nguyen, T. T. V. Nguyen, and H. H. Chu, *Genes and tolerant characteristics of soybean*. VNU Publishing House, 2011.
- [3] C. Engels, R. Fuganti-Pagliarini, S. R. R. Marin, F. C. Marcelino-Guimarães, M. C. N. Oliveira, N. Kanamori, J. Mizoi, K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki, and A. L. Nepomuceno, "Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration," *Genet Mol Biol.*, vol. 36, no. 4, pp. 556-565, 2013.
- [4] 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: 10.1038/s41598-019-55895-0.
- [5] T. N. L. Nguyen, P. Vaciata, 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.) Merrill]," *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering (VJSTE)*, vol. 63, pp. 60-64, 2020.

-
- [6] National Center for Biotechnology Information (NCBI), "Glycine max dehydration-responsive element binding protein 7 (LOC100101894), mRNA", 2021, [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001248108.2. [Accessed May 27, 2022].
- [7] National Center for Biotechnology Information (NCBI), "LOC100101894 dehydration-responsive element binding protein 7 [*Glycine max* (soybean)]". Gene ID: 100101894, updated on 1-May-2021 [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nuccore_gene&from_uid=1239290961. [Accessed May 27, 2022].
- [8] 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: 10.1590/S1516-89132015050170.
- [9] 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.
- [10] J. F. Topping, "Tobacco transformation," *Methods Mol. Biol.*, vol. 81, pp. 365-372, 1998.
- [11] 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.