

GENERATING GLUTAMINE SYNTHETASE ENCODED *GS1* TRANSGENIC MELIA AZEDARACH L. PLANTS ENHANCED NITROGEN

Ong Xuan Phong^{1,3}, Ly Khanh Linh², La Viet Hong³, Nguyen Van Phong⁴, Pham Bich Ngoc^{2*}

¹Graduate University of Sciences and Technology – VAST, ²Institute of Biotechnology - VAST

³Hanoi Pedagogical University 2, ⁴Vietnam National University of Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/8/2022	Glutamine synthetase encoded by the <i>GS1</i> gen is a nitrogen-assimilating enzyme that uses ammonia as a substrate for the ATP-dependent conversion of glutamic acid to glutamine. Based on the enzyme pair <i>XmaI</i> and <i>SacI</i> , we have successfully engineered pBI121/GmPrP2:GS1_cmyc:NOS and transformed it into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Carrying out the gen transformation experiment on more than 700 gen recipients that are stem segments in vitro, 33 regenerated and rooted shoots were obtained after 3 screenings on selective culture medium containing 50 - 150 mg /l kanamycin. The results of checking transgenic lines by PCR technique showed that 25/33 lines appeared with a bar with a size of ~1.1 kb, equivalent to the size of the <i>GS1</i> gen. The obtained results are the basis for the selection and breeding of transgenic species with fast growth gens.
Revised: 26/9/2022	
Published: 07/10/2022	
KEYWORDS	
GS1	
<i>Melia azedarach</i> L.	
Nitrogen	
Promoter	
Transgenic	

TẠO CÂY XOAN TA CHUYỂN GEN *GS1* MÃ HÓA GLUTAMINE SYNTHETASE TĂNG KHẢ NĂNG SỬ DỤNG NITROGEN

Ong Xuân Phong^{1,3}, Lý Khánh Linh², La Việt Hồng³, Nguyễn Văn Phong⁴, Phạm Bích Ngọc^{2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ⁴Trường Đại học Lâm nghiệp

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/8/2022	Glutamine synthetase được mã hóa bởi gen <i>GS1</i> là enzyme đồng hóa nitrogen, dùng amoniac như một cơ chất xúc tác cho phản ứng chuyển hóa glutamic acid thành glutamine phụ thuộc vào ATP. Dựa trên cặp enzyme <i>XmaI</i> và <i>SacI</i> , chúng tôi đã thiết kế thành công cấu trúc mang gen <i>GS1</i> (pBI121/GmPrP2:GS1_cmyc:NOS) và biến nạp vào vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Tiến hành thí nghiệm chuyển gen vào hơn 700 thể nhận gen là các đoạn thân mầm cây <i>in vitro</i> , đã thu được 33 chồi tái sinh và ra rễ sau 3 lần sàng lọc trên môi trường nuôi cấy chọn lọc có chứa 50 - 150 mg/l kanamycin. Kết quả kiểm tra các dòng xoan ta chuyển gen bằng kỹ thuật PCR đã cho kết quả 25/33 dòng xuất hiện băng vạch có kích thước ~ 1,1 kb, tương đương với kích thước của gen <i>GS1</i> . Kết quả thu được trong nghiên cứu là cơ sở cho việc chọn tạo giống xoan ta chuyển gen có khả năng sinh trưởng nhanh.
Ngày hoàn thiện: 26/9/2022	
Ngày đăng: 07/10/2022	
TỪ KHÓA	
Chuyển gen	
<i>GS1</i>	
Nitrogen	
Promoter	
Xoan ta	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6382>

* Corresponding author. Email: pbngoc77@gmail.com

1. Giới thiệu

Cây xoan ta là một trong những cây trồng được khuyến khích mở rộng diện tích trồng vì được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau như: lấy gỗ, làm than củi, thuốc trừ sâu sinh học... Thời gian sinh trưởng của xoan ta trong tự nhiên thường kéo dài từ 12 đến 15 năm mới cho khai thác, đây là một trong những trở ngại trong việc mở rộng diện tích trồng. Vì vậy, việc tạo ra các giống xoan ta rút ngắn thời gian sinh trưởng nhưng vẫn đảm bảo yêu cầu về chất lượng gỗ đang là hướng nghiên cứu phù hợp với yêu cầu thực tiễn. Hiện nay, đã có các nghiên cứu về cây lâm nghiệp chuyển gen làm tăng cường khả năng sinh tổng hợp gibberellin acid (chất điều hòa dạng hoạt động) bước đầu thu được kết quả [1]-[3]; chuyển gen liên quan tới việc nâng cao hiệu quả sử dụng nitơ, phospho... [4]-[6].

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật thì nitrogen là một trong những nguyên tố cần thiết và là nhân tố cấu trúc cơ bản tạo nên các phân tử nucleic acid và protein trong tế bào. Nitrogen trong cây có thể được đồng hóa hoặc tái sử dụng thông qua các cơ chế đồng hóa nitrogen từ môi trường và nitrogen giải phóng từ các quá trình quang hô hấp và các quá trình trao đổi chất khác như quá trình sinh tổng hợp phenyl propanoid và sự huy động nitrogen trong một vài protein. Các nghiên cứu về hóa sinh cho thấy trong tế bào protein GS tồn tại ở hai dạng isozymes chính: glutamine synthetase tế bào chất (GS1) và glutamine synthetase lục lạp (GS2). GS1 là một octamer enzyme bao gồm các tiểu đơn vị nhỏ, có khối lượng phân tử từ 38 - 41kDa, phụ thuộc vào các loài khác nhau [7], [8].

Cho đến nay các nghiên cứu chuyển gen GS1 đã thu được một số kết quả như: chuyển gen GS1 vào cây Dương lai cho thấy cây chuyển gen sinh trưởng nhanh hơn so với cây đối chứng (đạt 76% đối với cây 2 tháng tuổi và 21,3% đối với cây 6 tháng tuổi) [9]. Nghiên cứu chuyển gen GS1 vào cây thuốc lá dưới sự điều khiển của promoter CaMV 35S cho thấy các chỉ tiêu sinh lý sinh trưởng của cây chuyển gen đều cao hơn so với cây đối chứng ngay ở môi trường dinh dưỡng chứa nitrogen thấp [1].

Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen pBI121 chứa cấu trúc mang gen GS1, cấu trúc được chuyển vào cây xoan ta nhằm đánh giá hiệu quả biểu hiện của vector pBI121:GS1. Kiểm tra nhanh sự có mặt của gen GS1 trong các dòng xoan ta chuyển gen nhận thấy đã có sự tăng cường hiệu quả sử dụng nitrogen. Những kết quả này bước đầu đáp ứng phục vụ cho công tác cải thiện giống cây trồng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu chuyển gen là hạt giống xoan ta, chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chuyển gen pBI121:GS1 được Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế vector chứa cấu trúc mang gen chuyển GS1

Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện pBI121 mang cấu trúc GmPrP2:GA20ox:NOS (promoter GmPrP2 biểu hiện đặc hiệu ở rễ) được cắt bằng cặp enzyme XmaI và SacI. Tương tự, vector mang gen GS1 (đã được thiết kế bổ sung trình tự cmcy, tổng hợp bởi hãng Epoch Life Science, Hoa Kỳ) cũng được cắt bằng cặp enzyme này. Các đoạn pBI121/GmPrP2:NOS mở vòng và GS1-cmcy được tinh sạch và ghép nối với nhau để tạo vector chuyển gen.

2.2.2. Quy trình chuyển gen vào cây xoan ta

Chuyển cấu trúc mang gen GS1 vào mẫu mô cây xoan ta qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo quy trình chuyển gen đã được chúng tôi xây dựng và tối ưu hóa trên cơ sở sử dụng gen chỉ thị Gus-plus làm gen mô hình. Quy trình gồm các bước sau:

Chuyển gen vào thể nhận gen: Ngâm thể nhận gen trong dung dịch huyền phù *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen pBI121-GS1 30 phút (lây nhiễm). Thể nhận gen được thấm khô và chuyển lên môi đồng nuôi cấy: Môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 200 μ M acetosyringone trong 48 giờ (nuôi trong tối). Sau đó rửa khuẩn mẫu nuôi cấy và chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung chất chọn lọc: MS bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 150 mg/l kanamycin + 300 mg/l cefotaxime). Khi chồi tái sinh đạt chiều cao từ 2 cm đến 3 cm tiến hành cấy chuyển lên môi trường ra rễ MS + 0,3 mg/l IBA + 50 mg/l kanamycin. Cây sau khi ra rễ được rèn luyện và trồng trong nhà lưới để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR

Thực hiện phản ứng PCR nhận các đoạn gen trong lá xoan ta chuyển gen 1 tháng tuổi trồng trong nhà lưới với cặp mồi đặc hiệu GS1F (5'-CCGGGATGTCGAGCGTATTAACAGACC-3') và GS1R (5'-GAGCTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGA-3') theo chu trình nhiệt 94°C/4 phút; 30 chu kỳ [94°C/40 giây; 56°C/40 giây; 72°C/1 phút] 72°C/7 phút; bảo quản sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di và nhuộm EtBr, quan sát hình ảnh dưới ánh sáng đèn UV.

2.2.4. Kiểm tra biểu hiện ở mức mRNA bằng kỹ thuật RT-PCR

Tách RNA tổng số từ rễ, thân lá của dòng xoan ta chuyển gen GS1 dùng để tổng hợp cDNA và kiểm tra phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu GS1-Frt (5'-TCAAGGACATGACAGCGAAG-3'), GS1-Rrt (5'-GCTTTGTCAGCTCCAACTCC-3'), GADPH-F (5'-GGCTGTGGGAAAGGTCTTGCC-3') và GADPH-R (5'-CTAGCTTCCTTCGCCAGCCTC-3').

2.2.5. Phân tích và xử lý số liệu

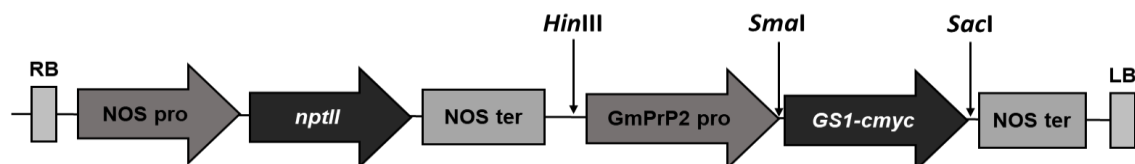
Số liệu được phân tích thống kê bằng chương trình Excel 2016 và sử dụng phương pháp giới hạn LSD_{0,05} để so sánh [10].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thiết kế vector chứa cấu trúc mang gen chuyển *GmPrP2:GS1_cmyc*

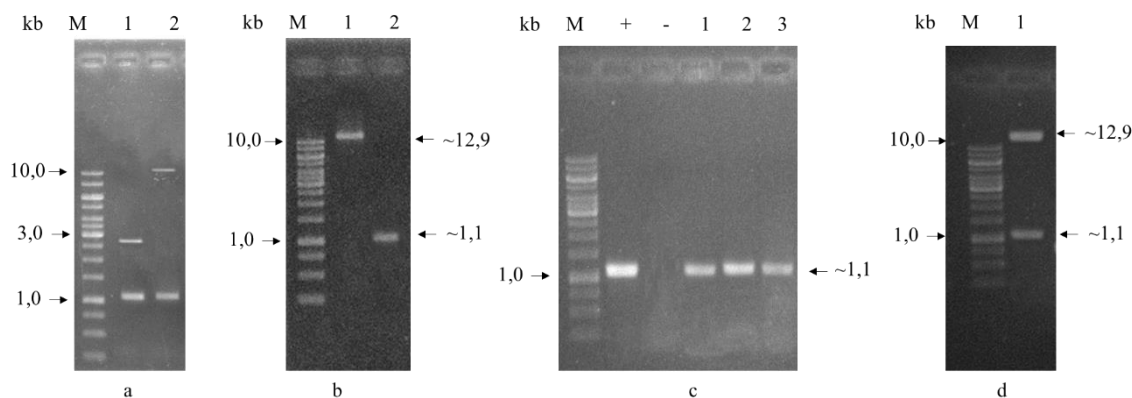
Promoter đóng vai trò rất quan trọng đối với sự biểu hiện của gen chuyển. Sự biểu hiện đặc hiệu tại mô hay cơ quan của gen chuyển được điều khiển bởi promoter đặc hiệu. Promoter *GmPrP2* được phân lập từ cây đậu tương cv Williams 82 đã hoạt động tốt ở cây *Arabidopsis* và rễ tơ cây đậu tương chuyển gen [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện gen *GS1* dưới sự điều khiển bởi promoter *GmPrP2*, sơ đồ được thể hiện ở Hình 1.

Xử lý vector pBT/GS1_cmyc và vector pBI121/GmPrP2:GA20ox:NOS chứa promoter *GmPrP2* bằng cặp enzyme *Sma*I và *Sac*I (Hình 2a), thu được GS1_cmyc và pBI121/GmPrP2 có đầu dính dính dính (Hình 2b), sau đó, 2 sản phẩm này được ghép nối với nhau thông qua đầu dính để tạo vector tái tổ hợp pBI121/GmPrP2:GS1_cmyc:NOS, vector này được tách dòng trong *E.coli*. Vector tái tổ hợp được biến nạp bằng xung điện vào *A.tumefaciens* phục vụ chuyển gen, sàng lọc nhanh bằng kỹ thuật colony-PCR và phương pháp cắt enzyme giới hạn chứng minh vector tái tổ hợp đã được thiết kế thành công (Hình 2c, 2d).



Hình 1. Sơ đồ cassette biểu hiện của vector pBI121/GmPrP2:GS1

RB: Biên phải; NOS pro: promoter nopaline synthase; nptII: gen mã hóa neomycin phosphotransferase II-kháng kháng sinh; GmPrP2 pro: promoter *GmPrP2*; GS1cmyc: glutamine synthetase 1 attached cmyc; NOS ter: terminator nopaline synthase; LB: Biên trái.



Hình 2. Hình ảnh sản phẩm điện di minh họa quá trình thiết kế vector chuyển gen *pBI₁₂₁/GmPrP2:GS1_cmyc:NOS*.

(a). Sản phẩm cắt *pBT/GS1_cmyc* (giếng 1) và *pBI₁₂₁/GmPrP2:GA20ox* (giếng 2) bằng cặp enzyme *SmaI* và *SacI*; (b) Sản phẩm *pBI₁₂₁/GmPrP2* (giếng 1) và *GS1_cmyc* (giếng 2) tinh sạch; (c) Sản phẩm Colony-PCR kiểm tra *GS1_cmyc* bằng cặp môi đặc hiệu (giếng 1-3), (+) đối chứng dương, (-) đối chứng âm; (d) Sản phẩm cắt kiểm tra *pBI₁₂₁/GmPrP2:GS1_cmyc:NOS* bằng cặp enzyme *SmaI* và *SacI*; (M). Thang DNA chuẩn 1 kb

3.2. Tạo cây xoan ta chuyển gen mang cấu trúc *pBI₁₂₁/GmPrP2:GS1*

Dựa theo các nghiên cứu đã công bố về sự tối ưu quá trình chuyển gen vào cây xoan ta cho thấy, thể nhận gen là đoạn thân mầm 2 tuần tuổi cho hiệu suất cao nhất. Kết quả thể hiện trong Bảng 1 cho thấy nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với hơn 700 thể nhận gen sử dụng vector chuyển gen *pBI₁₂₁* mang gen *GS1* dưới sự điều khiển của promoter *GmPrP2*. Kết quả đã thu được 217 chồi sống sót sau chọn lọc trên các môi trường tái sinh bổ sung kanamycin (chọn lọc lần 1 bổ sung 100 mg/l kanamycin, lần 2 bổ sung 150 mg/l kanamycin, lần 3 bổ sung 50 mg/l kanamycin). Kết quả có 33 chồi sinh trưởng và ra rễ cho thấy hiệu suất của quá trình chuyển gen *GS1* vào thân mầm cây xoan ta đạt tỉ lệ 15,24% qua ba lần chọn lọc. Một số giai đoạn của quá trình tạo dòng xoan ta mang gen chuyển *GS1* được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Hình ảnh minh họa các giai đoạn của quá trình tạo dòng xoan ta mang gen chuyển *GS1_cmyc*. (a). Thể nhận chuyển gen; (b). Đồng nuôi cấy lá mầm với vi khuẩn *A. tumefaciens*; (c), (d), (e). Tái sinh cụm chồi và chọn lọc chồi; (f). Cây xoan ta ngoài tự nhiên

Bảng 1. Kết quả tạo dòng xoan ta mang gen chuyển GS1_{cmcy}

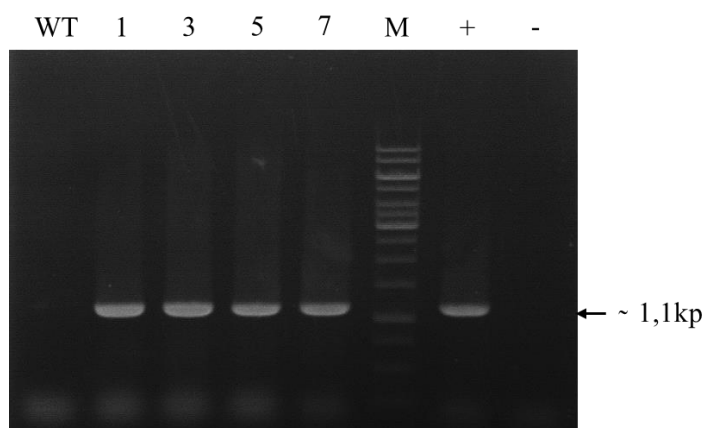
Lô thí nghiệm	Số mẫu cảm ứng tạo chồi			Chọn lọc chồi		
	Số mẫu	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số chồi	Số chồi sống sót và ra rễ	Tỷ lệ (%)
1	250	112	44,8	60	10	16,67
2	250	91	36,4	76	8	10,53
3	250	116	46,4	81	15	18,52
Tổng số	750	319		217	33	
Trung bình			42,53			15,24
1*	50	38	76	26	2	7,69
2*	50	42	84	30	30	30,00
Trung bình			59,27			11,46

Chú thích: 1 và 2* các chồi được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và không chứa kháng sinh*

Tất cả 33 dòng ra rễ trên môi trường chọn lọc, cây chuyển gen GS1 hoàn chỉnh được rèn luyện 2 tuần sau đó chuyển ra nhà lưới. Sau khi chuyển ra trồng trong nhà lưới, các dòng xoan ta chuyển gen tiếp tục được chăm sóc và phân tích sự có mặt của gen chuyển.

3.3. Phân tích sự có mặt của gen GS1 trong các dòng xoan ta chuyển gen

Hiện nay, kỹ thuật PCR được dùng để bước đầu sàng lọc các dòng cây chuyển gen [12]. Khi các dòng xoan ta chuyển gen trồng ngoài nhà lưới được 1 tháng tuổi tiến hành lấy lá tách chiết DNA tổng số để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển GS1 bằng phương pháp PCR, kết quả hình ảnh điện di sản phẩm thể hiện trên Hình 4.

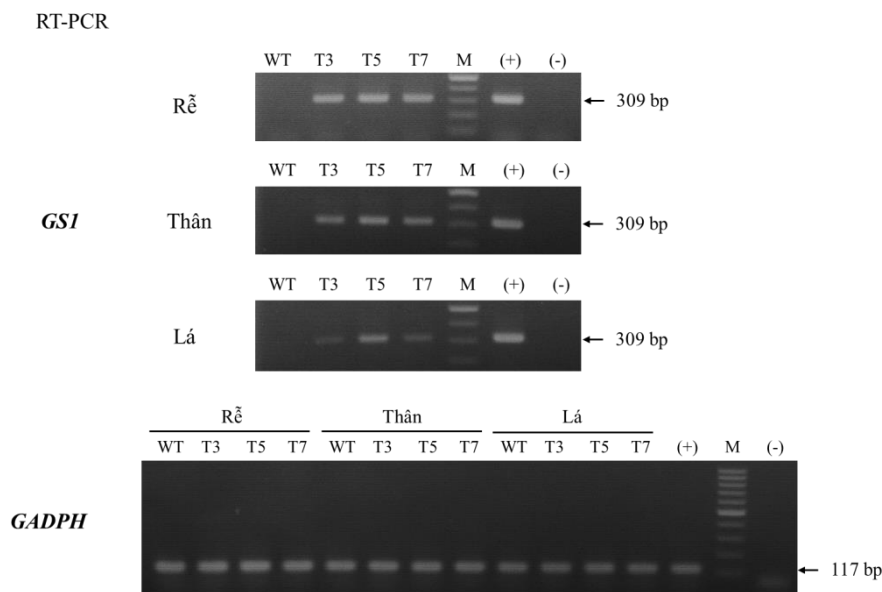


Hình 4. Điện di sản phẩm PCR. (M: Maker 10 kb; (-): đối chứng âm, cây xoan ta không chuyển gen; (+): đối chứng dương, plasmid mang gen GS1; 1, 3, 5, 7: các dòng xoan ta chuyển gen GS1)

Kết quả cho thấy 25/33 dòng xoan ta chuyển gen cho kết quả dương tính khi thực hiện phản ứng PCR (đều xuất hiện 01 băng điện di có kích thước ~ 1,1 kb, tương đương với kích thước của gen GS1) (Hình 2). Điều này bước đầu chứng tỏ các dòng cây này có thể mang gen chuyển GS1 như mong muốn.

3.4. Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển ở mức độ sau phiên mã

Kiểm tra sản phẩm của sự biểu hiện gen bằng cách tiến hành phản ứng RT-PCR với các mẫu cây chuyển gen bằng 2 cặp mồi GS1-Frt/Rrt và GADPH-F/R. Các mẫu RNA tổng số sử dụng cho phân tích RT-PCR được định lượng bằng máy Nanodrop2000 và pha loãng về cùng nồng độ (200 ng/μl) trước khi chạy phản ứng tổng hợp cDNA. Vì vậy, kết quả điện di ở Hình 5 cho thấy độ sáng tương tự nhau ở rễ, thân, lá đều cho thấy sự biểu hiện gen chuyển ở cấp độ mARN.



Hình 5. Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của gen chuyển *GS1* ở rễ, thân, lá trong các dòng xoan ta chuyển gen (M). Thang DNA chuẩn 1 kb.

Qua việc đánh giá kết quả tạo cây xoan ta chuyển gen *GS1* bởi vector mang cấu trúc pBI121/GmPrP2:GS1 ta thấy hiệu suất chuyển gen tương đương với hiệu suất chuyển các gen khác trên cùng đối tượng [1], [13].

4. Kết luận

Thiết kế thành công vector chứa cấu trúc mang gen chuyển pBI121/GmPrP2:GS1, thực hiện biến nạp bằng xung điện vào vi khuẩn *A. tumefaciens* để phục vụ chuyển gen. Chuyển thành công cấu trúc mang gen *GS1* liên quan đến khả năng đồng hóa nitrogen giúp cây sinh trưởng nhanh vào cây xoan ta thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả đã thu được 33 chồi ra rễ và sinh trưởng trên môi trường chọn lọc. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *GS1* bằng kỹ thuật PCR trên lá ở cây 1 tháng tuổi thì có 25/33 dòng cho kết quả dương tính. Kiểm tra mức độ hoạt động của gen chuyển *GS1* ở mức độ mARN cũng cho thấy sự biểu hiện ở cả rễ, thân, lá. Kết quả này là cơ sở để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo trong việc tạo ra các giống xoan ta chuyển gen có khả năng sinh trưởng nhanh đáp ứng mục đích sử dụng trong thực tế.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ của đề tài cấp nhà nước: “Nghiên cứu chọn tạo và đánh giá các dòng xoan ta chuyển gen sinh trưởng nhanh có triển vọng”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] X. D. Do, V. T. Bui, V. G. Ho, V. S. Le, and H. H. Chu, "Transformation of Gibberellin 20-oxidase encoded gene to paradise tree (*Melia azedarach* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*," *Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 2, pp. 217-222, 2011.
- [2] S. Huang, A. S. Raman, J. E. Ream, H. Fujiwara, R. E. Cerny, and S. M. Brown, "Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*," *Plant physiology*, vol. 118, no. 3, pp. 773-781, 1998.
- [3] L. K. Ly, T. P. Bui, P. T. Do, A. V. T. Le, P. Van Nguyen, and N. B. Pham, "Demonstration of improved plant growth and biomass production by At1g73160 promoter-controlled root-preferential expression of the AtGA20ox gene," *Research Square*, 2020, doi: 10.21203/rs.3.rs-19585/v42020.

-
- [4] Y. Wang, B. Fu, L. Pan, L. Chen, X. Fu, and K. Li, "Overexpression of Arabidopsis Dof1, GS1 and GS2 enhanced nitrogen assimilation in transgenic tobacco grown under low-nitrogen conditions," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 31, no. 4, pp. 886-900, 2013.
- [5] E. Nemeth, Z. Nagy, and A. Pecsvaradi, "Chloroplast Glutamine Synthetase, the Key Regulator of Nitrogen Metabolism in Wheat, Performs Its Role by Fine Regulation of Enzyme Activity via Negative Cooperativity of Its Subunits," *Front Plant Sci*, vol. 9, p. 191, 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.00191.
- [6] Z. Zhang, S. Xiong, Y. Wei, X. Meng, X. Wang, and X. Ma, "The role of glutamine synthetase isozymes in enhancing nitrogen use efficiency of N-efficient winter wheat," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 1000, Apr 20, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01071-1.
- [7] T. W. Becker, M. Caboche, E. Carayol, and B. Hirel, "Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato," *Plant Molecular Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 367-379, 1992.
- [8] F. R. Cantón, M.-F. Suárez, M. Jose-Estanyol, and F. M. Cánovas, "Expression analysis of a cytosolic glutamine synthetase gene in cotyledons of Scots pine seedlings: developmental, light regulation and spatial distribution of specific transcripts," *Plant molecular biology*, vol. 40, no. 4, pp. 623-634, 1999.
- [9] F. Gallardo, J. Fu, F. R. Cantón, A. García-Gutiérrez, F. M. Cánovas, and E. G. Kirby, "Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar," *Planta*, vol. 210, no. 1, pp. 19-26, 1999.
- [10] V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Hanoi: Hanoi National University Publishing House, 2013.
- [11] L. Chen, B. Jiang, C. Wu, S. Sun, W. Hou, and T. Han, "GmPRP2 promoter drives root-preferential expression in transgenic Arabidopsis and soybean hairy roots," *BMC plant biology*, vol. 14, p. 245, September 16, 2014, doi: 10.1186/s12870-014-0245-z.
- [12] T. B. Le, V. C. Phan, V. H. Nong, N. H. Truong, and Q. H. Le, *Application of molecular techniques in the study of biological resources in Vietnam*. Ha Noi: Science and Technology Publishing House, 2003.
- [13] V. T. Bui, X. D. Do, V. S. Le, and H. H. Chu, "The high frequency of transformation procedure for expression of gus gene in chinaberry tree (*Melia azedarach* L.) using *Agrobacterium*," *Journal of Biotechnology*, vol. 35, no. 2, pp. 227-233, 2013.