

## STUDY ON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*-MEDIATED TRANSFORMATION OF *GmDREB6* GENE IN VIETNAMESE SOYBEAN CULTIVAR DT22

Phutthakone Vaciaxa<sup>1,2</sup>, Tran Thi Hong<sup>1</sup>, Pham Thi Thanh Nhan<sup>1</sup>, Vu Thi Thu Thuy<sup>1</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>TNU - University of Education

<sup>2</sup>Khangkhay Teacher Training College, Xiangkhoang, Laos

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Received:</b> 15/12/2020</p> <p><b>Revised:</b> 30/12/2020</p> <p><b>Published:</b> 18/01/2021</p>	<p>Transcription factor studies of the DREB subfamily have confirmed that <i>GmDREB6</i> is related to salt tolerance in soybean plants. In this report, the <i>GmDREB6</i> gene was used to genetically transform into 450 cotyledons of soybean cultivar DT22 through <i>Agrobacterium tumefaciens</i> carrying transgenic vector <i>pBI121_GmDREB6</i>. Of the samples infected with recombinant <i>A. tumefaciens</i>, 185 transformed samples were regenerated multiple-shoots and 583 shoots were produced. Selective results by kanamycin antibiotic in SIM and SEM medium obtained 109 shoots to switch to rooting medium and 53 plants were planted on the substrate and 12 plants growing normally under greenhouse conditions. Molecular analysis of 12 transgenic lines in the T0 generation had 8 lines positive for PCR, the transgenic efficiency at the PCR analysis stage was 1.78%.</p>
<p><b>KEYWORDS</b></p> <p>Genetic transformation</p> <p>Salt tolerance</p> <p>Transgenic soybean</p> <p><i>GmDREB6</i> gene</p> <p>Cotyledon node</p>	

## NGHIÊN CỨU BIẾN NẠP GEN *GmDREB6* THÔNG QUA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

Phutthakone Vaciaxa<sup>1,2</sup>, Trần Thị Hồng<sup>1</sup>, Phạm Thị Thanh Nhân<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Thủy<sup>1</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Cao đẳng Sư phạm Khang Khay, Xiêng Khoang, Lào

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p><b>Ngày nhận bài:</b> 15/12/2020</p> <p><b>Ngày hoàn thiện:</b> 30/12/2020</p> <p><b>Ngày đăng:</b> 18/01/2021</p>	<p>Các nghiên cứu về nhân tố phiên mã thuộc phân họ DREB đã xác nhận rằng <i>GmDREB6</i> liên quan đến khả năng chịu mặn ở cây đậu tương. Trong báo cáo này, gen <i>GmDREB6</i> được sử dụng để biến nạp vào 450 mảnh lá mầm của giống đậu tương ĐT22 thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang vector chuyển gen <i>pBI121_GmDREB6</i>. Trong số các mẫu được lây nhiễm bởi <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp đã có 185 mẫu tạo chồi và có 583 chồi được tạo ra. Sau chọn lọc bằng kanamycin trong môi trường SIM và SEM đã 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. Phân tích phân tử của 12 dòng cây chuyển gen ở thế hệ T0 đã có 8 dòng dương tính với PCR, hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích là 1,78%.</p>
<p><b>TỪ KHÓA</b></p> <p>Biến nạp di truyền</p> <p>Chịu mặn</p> <p>Đậu tương chuyển gen</p> <p>Gen <i>GmDREB6</i></p> <p>Nách lá mầm</p>	

\* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

## 1. Mở đầu

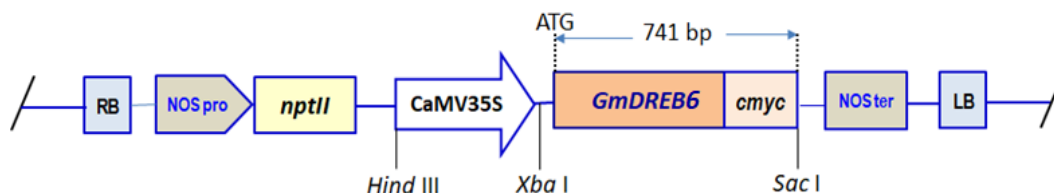
Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây thực phẩm quan trọng mang lại nhiều giá trị về kinh tế, dinh dưỡng và cải tạo đất, nhưng thuộc nhóm cây chống chịu kém các yếu tố bất lợi phi sinh học, như hạn, mặn, nóng, lạnh, ... [1]. Vì vậy, nghiên cứu tạo dòng đậu tương có khả năng chống chịu tốt các stress phi sinh học là vấn đề được quan tâm trong nhiều thập kỷ gần đây, đặc biệt trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay. Nhiều cách tiếp cận nghiên cứu cải thiện khả năng chống chịu của cây đậu tương đã được tiến hành, trong đó có kỹ thuật chuyển gen mã hóa các protein là nhân tố phiên mã. DREB (Dehydration- Responsive Element Binding) có chức năng kích hoạt nhóm gen liên quan đến tính chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học [2]. Miền AP2 của protein DREB có khoảng 58 - 59 amino acid và gồm một số amino acid liên quan đến yếu tố phản ứng khử nước DRE (dehydration responsive element) hoặc hộp GCC box [3], [4]. Trình tự *cis* và nhân tố *trans* giữ vai trò quan trọng trong sự biểu hiện gen đáp ứng các stress phi sinh học. Phân họ protein DREB ở đậu tương có nhiều thành viên, trong đó có DREB6 [5]. Zhang và cs đã chứng minh rằng, sự biểu hiện của gen *OsDREB* từ cây lúa nước làm tăng sự biểu hiện của gen *P5CS* ở đậu tương [6]. Bằng kỹ thuật chuyển gen và phân tích biểu hiện mạnh gen ở cây đậu tương, một số tác giả đã chứng minh nhân tố phiên mã DREB6 kích hoạt và làm tăng hoạt động phiên mã của gen *GmP5CS* và làm tăng sự tích lũy amino acid proline ở cây thuốc lá [7], ở cây đậu tương [8], [9] trong điều kiện xử lý hạn và mặn nhân tạo.

Giống đậu tương ĐT22 được chọn tạo bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ thuộc Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, hiện nay được trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam. ĐT22 có hoa màu trắng, hạt vàng, rôn nâu đậm, quả chín có màu nâu, khối lượng 1000 hạt là 155 - 160 g, năng suất trung bình từ 18 - 27 (tạ/ha), thời gian sinh trưởng ngắn, trung bình 85 - 90 ngày và có khả năng kháng bệnh phấn trắng. Tuy nhiên, giống đậu tương ĐT22 cùng với các giống DT12, DT94, W82, DT2003, DT2001, DT51, D2101, DT22, DT96, DT95, D8, DT90, DT83, DT84, DT30 được đánh giá có khả năng chịu mặn thấp [10]. Chính vì vậy, nghiên cứu nâng cao khả năng chịu mặn của các giống đậu tương là rất cần thiết trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn gen *GmDREB6*, một thành viên của phân họ DREB trong hệ gen đậu tương làm gen chuyển và chọn giống đậu tương ĐT22 làm đối tượng nhận gen để thực hiện thí nghiệm chuyển gen nhằm nâng cao khả năng chịu mặn của giống đậu tương này.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Hạt của giống đậu tương ĐT22 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp. Chủng *A.tumefaciens* chứa vector chuyển gen *pBI121\_GmDREB6* (Hình 1) [11] là sản phẩm của đề tài B2017-TNA-38 được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.



**Hình 1.** Sơ đồ vector *pBI121\_GmDREB6* [11]. LB: đường biên T-DNA bên trái; RB: đường biên T-DNA bên phải; *nptII*: neomycin-phospho-transferase II (gen kháng kháng sinh kanamycin); *CaMV35S*: promoter 35S của virus khảm súp lơ; *GmDREB6*: Gen *GmDREB6* được phân lập từ mRNA của cây đậu tương; *c-myc*: trình tự nucleotide mã hóa peptide *c-myc*.

Môi trường cơ bản MS [12] bổ sung vitamin B5. Các chất điều hòa sinh trưởng: Benzyl amino purine (BAP), Indol - 3 - butiric acid (IBA)...; kháng sinh kanamycin, cefotaxim; Các hóa chất khác như yeast extract, bacto pepton, trypton, NaCl, agar, sucrose, glycerol, acetosyringone, L-cystein, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, phosphinothricin được cung cấp bởi các hãng như New England Biolabs (Anh), Amersham Pharmacia Biotech (Thụy Điển), Chemicals (Đức), Sigma (Mỹ), Duchefa (Hà Lan), Merck (Đức) và Wako (Nhật Bản). Thành phần của môi trường này mầm, đồng nuôi cấy, cảm ứng tạo chồi và tái sinh *in vitro* sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22 được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Môi trường này mầm, đồng nuôi cấy, cảm ứng tạo chồi, tái sinh cây chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22

Môi trường	Thành phần
Hạt nảy mầm (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 1ml/l.
Đồng nuôi cấy (CCM đặc)	Muối B5 0,316 g/l + BAP 1,7 mg/l + MES 3,9 g/l + GA <sub>3</sub> 0,25 mg/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 <sub>3</sub> 0,25 mg/l.
Tạo đa chồi (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 + cefotaxim 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + kanamycin 50 mg/l (lần 1) và kanamycin 75 mg/l (lần 2).
Kéo dài chồi (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; bổ sung cefotaxim 500 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + GA <sub>3</sub> 500 mg/l + IAA 100 mg/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l + kanamycin 50 mg/l.
Ra rễ (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 cefotaxim 250 mg/l + IBA 0,1 mg/l + vitamin B5 1000X 1 ml/l + L-asparagine monohydrate 50 mg/l + kanamycin 50 mg/l.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen

Phương pháp chuyển gen thông qua nách lá mầm được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Olhoft và cs [13] và Nguyễn Thu Hiền và cs [14].

**Tạo nguyên liệu biến nạp gen:** Hạt đậu tương sau khi khử trùng bằng khí clo từ hỗn hợp javen 100 ml + HCl 3 ml đậm đặc được nảy mầm trên môi trường MS (Bảng 1). Sau 5 ngày, lá mầm được tách đôi, loại bỏ đỉnh sinh trưởng, sử dụng làm nguyên liệu biến nạp gen và nuôi cấy *in vitro*.

**Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm:** Nuôi chọn lọc vi khuẩn trong 15 ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc là kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C, 150 rpm trong 48 giờ. Chuyển 10 ml dịch huyền phù tế bào trên vào 50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi ở 28°C, 150 rpm đến khi OD<sub>600nm</sub> = 0,8 là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp. Ly tâm dịch tế bào ở 4 °C, 5000 rpm trong 15 phút. Hoà tan tế bào lắng tạo huyền phù vi khuẩn vào 40 ml dung dịch môi trường CCM đặt trong nước đá lạnh.

**Lây nhiễm và đồng nuôi cấy:** Các mảnh lá mầm tương được gây tổn thương bằng mũi dao và kim nhọn ở phần nách lá mầm. Các mảnh lá mầm đã tổn thương được ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens* mang vector *pBI121\_GmDREB6* trong thời gian 30 phút. Sau đó, các mẫu biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc không kháng sinh. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25°C trong thời gian 5 ngày.

**Cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM:** Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được rửa trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM), bổ sung cefotaxim 400 mg/l với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Đặt mẫu lên môi trường tạo chồi SIM, bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l (lần 1). Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc, bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 75 mg/l (lần 2).

**Kéo dài chồi:** Sau 3 tuần, các cụm chồi sống sót trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh được loại bỏ lá mầm và chuyển sang môi trường phát triển kéo dài chồi (SEM), bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l.

**Tạo rễ:** Khi các chồi phát triển đạt kích thước từ 3 – 4 cm sẽ được chuyển sang môi trường tạo rễ (RM) có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh.

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

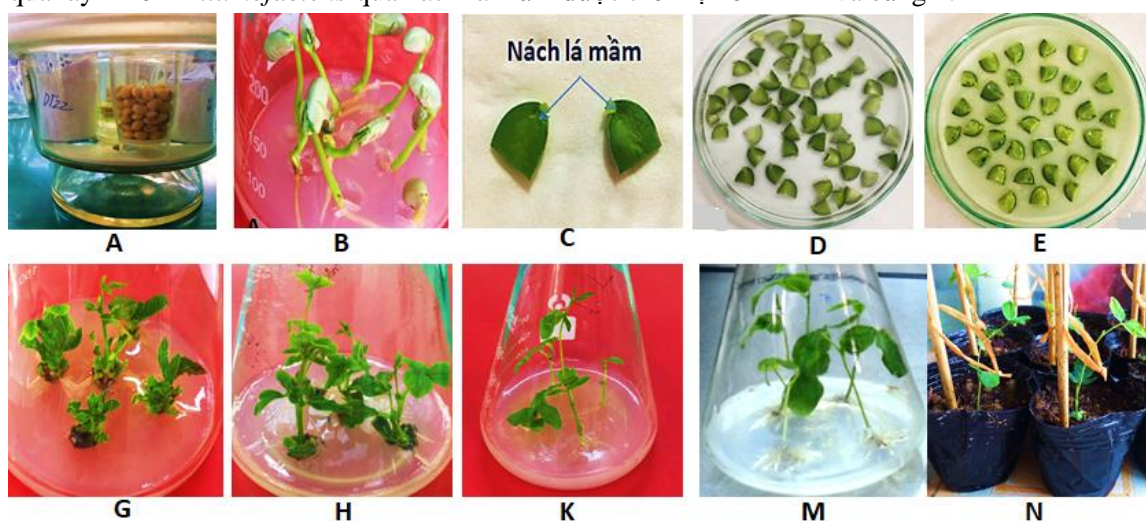
### 2.2.2. Xác nhận sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây đậu tương chuyển gen theo Saghai-Marooof và cs [15]. Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *GmDREB6\_XbaI-F/GmDREB6\_c-myc-SacI-R* [11] để xác định sự có mặt của gen *GmDREB6* trong cây chuyển gen. Trình tự nucleotide của mồi *GmDREB6\_XbaI-F* là: 5'-CATAGAAGAAGCCACTAACACTACA-3'; và mồi *GmDREB6\_c-myc-SacI-R* là: ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGT. Đoạn DNA được nhân bản dự kiến có kích thước là 741 bp. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

## 3. Kết quả nghiên cứu

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

Hạt của giống đậu tương ĐT22 được khử trùng và cho nảy mầm trên môi trường GM để thu lá mầm làm nguyên liệu biến nạp. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB6* thông qua lây nhiễm *A.tumefaciens* qua nách lá mầm được thể hiện ở hình 2 và bảng 2.



**Hình 2.** Hình ảnh quá trình biến nạp và tái sinh cây đậu tương chuyển gen.

**A:** Hạt đậu tương ĐT22 sau được khử trùng bằng khí clo từ hỗn hợp javen 100 ml + HCl 3 ml; **B:** Hạt nảy mầm trên môi trường GM; **C:** Lá mầm thu từ hạt nảy mầm; **D:** Lá mầm đã gây tổn thương ngâm trong dịch *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen *pBI121\_GmDREB6* trong 30 phút. **E:** Các lá mầm biến nạp được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM trong tối, ở 25 °C trong thời gian 5 ngày; **G:** Các lá mầm được đặt trên môi trường cảm ứng tạo đa chồi SIM, bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l trong 2 tuần (lần 1). Sau đó, các lá mầm được chuyển sang môi trường SIM đặc, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 75mg/l trong 3 tuần (lần 2); **H:** Các chồi sống sót trong môi trường chọn lọc bằng Km được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM, bổ sung cefotaxim 400mg/l và kanamycin 50 mg/l; **K, M:** Các chồi sống sót sau chọn lọc được chuyển sang môi trường tạo rễ RM, bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh; **N:** Các cây có bộ rễ phát triển được chuyển ra trồng trên giá thể có tỷ lệ 2 đất thịt : 1 trấu hun : 2 sơ dừa trong nhà lưới.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy các mẫu đối chứng không chuyển gen (ĐC1) không có khả năng tạo chồi trong môi trường chứa kháng sinh chọn lọc; còn trong môi trường không chứa kháng sinh đã có 21/30 mẫu tạo chồi với 53 chồi, trong đó có 42 chồi được chuyển sang môi trường kéo dài và 34 chồi ra rễ trên môi trường RM. Chuyển 30 cây trồng trên giá thể và kết quả có 11 cây sống trong điều kiện nhà lưới.

Trong lô thí nghiệm, với 450 mẫu biến nạp, lặp lại 3 lần đã có 185 mẫu tạo chồi và tổng số chồi được tạo thành là 583 chồi. Chuyển 174 chồi sang môi trường SEM, kết quả chọn lọc bằng kháng sinh thu 152 chồi sinh trưởng phát triển tốt. Các chồi đã qua chọn lọc bằng kháng sinh được nhân lên để tạo các dòng chuyển gen T0 và chọn 109 chồi chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả chuyển 53 dòng cây T0 ra trồng trên giá thể và thu được 12 dòng cây T0 sống sót trong điều kiện nhà lưới.

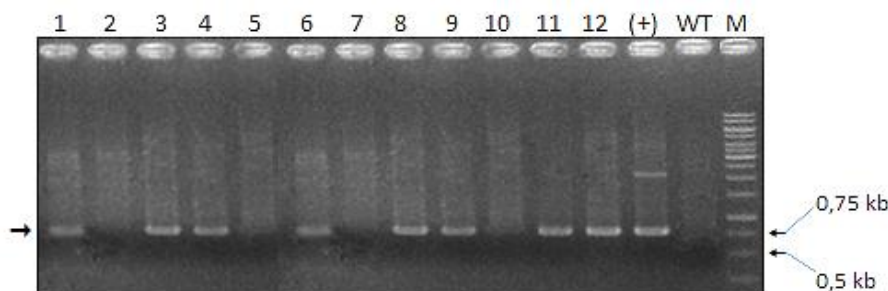
**Bảng 2.** Kết quả biến nạp gen *GmDREB6* vào giống đậu tương ĐT22

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

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

### 3.2. Phân tích PCR và nhân giống *in vitro* cây đậu tương chuyển gen

Các cây T0 trong nhà lưới được sử dụng phân tích để xác nhận sự có mặt của gen chuyển *GmDREB6* trong hệ gen của cây chuyển gen. DNA tổng số tách từ lá non của 12 dòng cây T0 được sử dụng cho phân tích PCR với cặp mồi *GmDREB6\_XbaI-F/GmDREB6\_c-myc-SacI-R*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn DNA *GmDREB6\_c-myc* được thể hiện ở hình 3. Kết quả phân tích điện di ở hình 3 cho thấy băng DNA có kích thước khoảng gần 750 bp xuất hiện ở 8 dòng đậu tương chuyển gen số 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, trong khi các dòng số 2, 5, 7, 10 không xuất hiện băng DNA này. Như vậy, bước đầu có thể xác nhận gen chuyển *GmDREB6* đã hiện diện trong hệ gen của 8 dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0, ký hiệu là T0-1, T0-3, T0-4, T0-6; T0-8, T0-9, T0-11, T0-12.



**Hình 3.** Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại cấu trúc chứa gen *GmDREB6* trong hệ gen các cây đậu tương chuyển gen. M: thang DNA 1 kb; WT: cây đậu tương không chuyển gen; (+) plasmid *pBI121\_GmDREB6* làm đối chứng dương; 1-12: các dòng cây đậu tương chuyển gen *GmDREB6*

#### 4. Thảo luận

Nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương nhờ *A. tumefaciens* chứa cấu trúc mang gen chuyển qua nách lá mầm đã tổn thương đã được công bố bởi nhiều tác giả. Việc gây tổn thương nách lá mầm cần phải có các thao tác kỹ thuật phù hợp thì mới tạo đủ mô đích cho sự xâm nhiễm của vi khuẩn [13], [16]. Tuy nhiên, mức độ hình thành chồi ở nách lá mầm không những phụ thuộc vào kỹ thuật gây tổn thương mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của kiểu gen cây đậu tương [17]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu [9], [14], [18]-[22] cũng đã thành công trong chuyển gen ở đậu tương bằng cách lây nhiễm *A. tumefaciens* mang cấu trúc gen chuyển qua nách lá mầm tổn thương. Bằng phương pháp này, chúng tôi cũng đã thành công biến nạp vector pBI121\_GmDREB6 vào giống đậu tương Việt Nam DT22 với số chồi tái sinh đạt trung bình 3,15 chồi/mẫu. Kết quả 3 lần chọn lọc bằng kháng sinh kanamycin ở các giai đoạn tạo chồi, kéo dài chồi và ra rễ, đã chọn được 53 cây đậu tương trồng trên giá thể. Sử dụng PCR với cặp mồi GmDREB6\_XbaI-F/GmDREB6\_c-myc-SacI-R đã xác nhận gen chuyển *GmDREB6* đã có mặt trong hệ gen của 8 cây chuyển gen T0.

Trong hệ gen của cây đậu tương chuyển gen có gen *GmDREB6* nội tại và gen chuyển *GmDREB6*. Vùng mã hóa của gen nội tại và gen chuyển *GmDREB6* đều có kích thước 693 bp, mã hóa 230 amino acid. Nếu sử dụng PCR với cặp mồi được thiết kế để khuếch đại vùng mã hóa thì kết quả duy nhất chỉ có đoạn DNA khoảng 0,7 kb và không thể xác định được gen chuyển *GmDREB6* có được hợp nhất vào hệ gen của cây đậu tương được chuyển gen hay không. Do vậy, để phân tích cây đậu tương chuyển gen, chúng tôi thiết kế cặp mồi PCR nhằm nhân bản đoạn DNA bao gồm gen *GmDREB6*, các trình tự chứa điểm cắt của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI*. Trong vector chuyển gen *pBI121\_GmDREB6*, cấu trúc *GmDREB6-c-myc* bao gồm đoạn gen *GmDREB6*, chứa vùng mã hóa 693 bp, đoạn 8 bp (GCTCTAGA) ở đầu 5' chứa vị trí cắt cho *XbaI*, trình tự có kích thước 33 bp mã hóa cho kháng nguyên *c-myc* và đoạn 7 bp (GAGCTCG) ở 3' cuối chứa vị trí cắt cho *SacI*. Như vậy, cấu trúc *pBI121\_GmDREB6\_c-myc* có kích thước là 741 bp (Hình 1). Cặp mồi PCR *GmDREB6\_XbaI-F/GmDREB6\_c-myc-SacI-R* được thiết kế để khuếch đại cấu trúc *GmDREB6-c-myc* và kết quả kiểm tra bằng điện di trên gel agarose đã xuất hiện băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 0,75 bp (Hình 3).

Ở Việt Nam, hiệu suất chuyển gen ở đậu tương ở giai đoạn phân tích PCR đã được báo cáo. Hiệu suất chuyển gen *P5CSm* vào giống đậu tương DT84 đạt 0,24% [23], chuyển gen HA1 vào giống DT12 đạt 1,23% [14], biến nạp cấu trúc RNAi vào giống DT12 là 1,35%, vào giống DT2008 là 2,24% [20], chuyển gen *GmEXPI* vào giống DT84 đạt 0,53% [21], chuyển gen *GmDREB2* vào giống DT84 đạt 2,64% [9], chuyển gen *GmCHI* vào giống DT2008 đạt 2,05% [22]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hiệu suất chuyển gen *GmDREB6* ở giai đoạn phân tích PCR đạt 1,78%. Như vậy có thể thấy rằng, hiệu suất chuyển gen gián tiếp nhờ *A.tumefaciens* ở cây đậu tương không chỉ phụ thuộc vào đặc điểm kiểu gen và khả năng tiếp nhận gen của giống, mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của cấu trúc gen được chuyển vào cây đậu tương.

#### 5. Kết luận

Cấu trúc mang gen *GmDREB6* đã biến nạp thành công vào giống đậu tương DT22 qua nách lá mầm nhờ *A.tumefaciens*. Đã tái sinh được 583 chồi từ 450 mẫu biến nạp và sau 3 lần chọn lọc bằng kanamycin, nhân *in vitro* đã thu được 53 cây được trồng trên giá thể và 12 cây sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới. Phân tích các dòng chuyển gen *GmDREB6* ở thế hệ T0 bằng PCR với cặp mồi *GmDREB6\_XbaI-F/GmDREB6\_c-myc-SacI-R* xác định được 8/12 dòng dương tính với PCR, hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích là 1,78%. Tám dòng đậu tương chuyển gen *GmDREB6* được tiếp tục phân tích phân tử để tạo dòng đậu tương chuyển gen chịu mặn.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo trong đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB mới định hướng ứng dụng trong cải thiện tính

kháng các yếu tố bất lợi phi sinh học của cây đậu tương [*Glycine max* (L.) Merr.]” thuộc Chương trình phát triển khoa học cơ bản trong lĩnh vực Hóa học, Khoa học sự sống, Khoa học trái đất và Khoa học Biển giai đoạn 2017-2025.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. M. Chu, T. T. H. Nguyen, V. T. T. Nguyen, and H. H. Chu, *Genes and drought tolerance properties of soybean plants*. Viet Nam National University Publishing House, Hanoi, 2011.
- [2] Z. S. Xu, M. Chen, L. C. Li, and Y. Z. Ma, “Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement,” *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 53, pp. 570-585, 2011.
- [3] D. Kizis, V. Lumberras, and M. Pages, “Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress,” *FEBS letters*, vol. 498, pp. 187-189, 2001.
- [4] M. Tang, J. Sun, Y. Liu, F. Chen, and S. Shen, “Isolation and functional characterization of the JcERF gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*,” *Plant Molecular Biology*, vol. 63, pp. 419-428, 2007.
- [5] T. H. Phang, G. H. Shao, and H. M. Lam, “Salt tolerance in soybean,” *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 50, pp. 1196-1212, 2008.
- [6] X. Zhang, Y. Tang, Q. Ma, C. Yang, Y. Mu, H. Suo, L. Luo, and H. Nian, “OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean,” *PLoS One*, vol. 8, e83011, 2013, doi: 83010.81371/journal.pone.0083011.
- [7] T. X. 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,” *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 58, pp. 651-657, 2015.
- [8] Q. H. Nguyen, L. T. K. Vu, L. T. N. Nguyen, N. T. T. Pham, Y. T. H. Nguyen, S. V. Le, and M. H. Chu, “Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants,” *Scientific Reports*, vol. 9, Article number: 19663, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55895-0.
- [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] D. M. C. Nguyen, T. C. Nguyen, T. N. Nguyen, T. L. A. Nguyen, T. T. Nguyen, T. X. Pham, and N. T. Quach, “Evaluation of salinity tolerance of some popular soybean varieties in Vietnam,” *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 74, pp. 60-66, 2017.
- [11] T. N. L. Nguyen, P. Vaciata, T. M. T. Lo, T. H. Y. Nguyen, T. T. N. Pham, V. S. Le, and H. M. Chu, “Design of Construct Carrying *GmDREB6* to Enhance Soybean Gene Expression Related to Abiotic Stress Response,” *European Journal of Engineering Research and Science*, vol. 4, no. 6, pp. 135-139, 2019.
- [12] T. Murashige, and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [13] P. M. Olhoft, C. M. Donovan, and D. A. Somers, “Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants,” *Methods in molecular biology*, vol. 343, pp. 385-396, 2006.
- [14] T. H. Nguyen, H. M. Chu, H. H. Chu, and V. S. Le, “Study on regeneration and genetic transformation via cotyledons node of two soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merrill) DT12 and DT84 by *Agrobacterium*,” *Vietnamese Journal of Biotechnology*, vol. 8, pp. 1305-1310, 2011.
- [15] M. A. Saghai-Marooft, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, “Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics,” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 81, pp. 8014- 8018, 1984.
- [16] T. Yamada, K. Takagi, and M. Ishimoto, “Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis,” *Breeding Science*, vol. 61, pp. 480-494, 2012.
- [17] M. M. Paz, H. Shou, Z. Guo, Z. Zhang, A. K. Banerjee, and K. Wang, “Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant,” *Euphytica*, vol. 136, pp. 167-179, 2004.

- 
- [18] T. C. H. Tran, "Research on the transgenic response-ability of soybean varieties grown in Vietnam," *Vietnamese Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 18, pp. 11-16, 2007.
- [19] T. T. H. Nguyen, T. N. D. Tran, T. H. Nguyen, H. M. Chu, V. S. Le, and H. H. Chu, "In vitro regeneration system development in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill) for gene transfer," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 52, pp. 82-88, 2009.
- [20] T. M. T. Lo, T. H. T. Le, H. H. Chu, and H. M. Chu "Research on the creation of transgenic soybean plants resistant to soybean mosaic virus and yellow bean mosaic virus," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 118, pp. 111-115, 2014.
- [21] T. S. Lo, "Study on characterization and transformation of GmEXP1 gene related to the root development of soybean," Ph.D. thesis in Biology, Thai Nguyen University, 2015.
- [22] H. Q. Nguyen, T. H. T. Le, T. N. L. Nguyen, T. G. Nguyen, D. T. Sy, Q. T. Tu, T. T. T. Vu, V. S. Le, H. M. Chu, and T. K. L. Vu, "Overexpressing GmCHI1A increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds," *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, doi: 10.1007/s11627-020-10076-x.
- [23] T. T. H. Nguyen, "Isolation, creating point mutation in P5CS gene related to drought tolerance and genetic transformation of *P5CSm* gene into Vietnamese soybean plants," Ph.D. thesis in Biology, Thai Nguyen University, 2011.