STRUCTURE AND ACTIVITY OF PLANT TRANSGENIC VECTOR CARRYING GENE ENCODING CHOLINE OXIDASE

Ngo Manh Dung[1], Ta Thi Dong[2], Nguyen Hong Nhung[2], Nguyen Van Doai[2], Chu Hoang Ha[2], Chu Hoang Mau[1*]

[1]TNU - University of Education, [2]Institute of Biotechnology - VAST

ARTICLE INFO

Received: 05/8/2021

Revised: 31/10/2021

Published: 31/10/2021

KEYWORDS

codA gene

Glycine betaine

Plant transgenic vetor

Choline oxydase

Abiotic stress

ABSTRACT

CodA gene encoding choline oxidase has effectively increased the tolerant capability in plants. In this study, Three transgenic vectors including *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29-codA* carrying *codA* gene under the control of *35S, HSP* and *rd29A* promoters, respectively, are constructed. The transgenic vectors were transformed into K326 *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens* CV58/pGV2260. *CodA* transgenic tobacco plants carrying transgenic vectors controlled by different inducible promoters resulted in the accumulation of different glycine betain (GB) concentrations, ranging from 12.43 - 13.89 mg g^{-1} dry weight (mg g^{-1} DW) was higher than the cumulative GB content of the control plant which was 9.88 mg g^{-1} DW. Thus, under adverse conditions of temperature, humidity and water, transgenic tobacco lines survived and developed by accumulating higher levels of glycine betaine than non-transgenic tobacco plants. The results of *codA* gene expression in tobacco with a transgenic efficiency of 42.64 - 54.23% are the basis for analysis of *codA* gene expression in other crops.

CẤU TRÚC VÀ HOẠT ĐỘNG CỦA VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN MÃ HOÁ CHOLINE OXYDASE

Ngô Mạnh Dũng[1], Tạ Thị Đông[2], Nguyễn Hồng Nhung[2], Nguyễn Văn Đoài[2], Chu Hoàng Hà[2], Chu Hoàng Mậu[1*]

[1]Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

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

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 05/8/2021

Ngày hoàn thiện: 31/10/2021

Ngày đăng: 31/10/2021

TỪ KHÓA

Gen *codA*

Glycine betaine

Vector chuyển gen thực vật

Choline oxydase

Stress phi sinh học

TÓM TẮT

Gen *codA* mã hóa cho enzyme choline oxydase có khả năng làm tăng tính chống chịu của thực vật. Trong nghiên cứu này, ba vector chuyển gen *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29A-codA* mang gen *codA* dưới sự điều khiển của promoter *35S, HSP* và *rd29A* được thiết kế thành công. Các vector chuyển gen được biến nạp vào cây thuốc lá K326 nhờ *Agrobacterium tumefaciens CV58/pGV2260*. Các cây thuốc lá chuyển gen *codA* mang các vector chuyển gen điều khiển bởi các promoter cảm ứng khác nhau cho kết quả tích lũy hàm lượng glycine betain (GB) khác nhau, dao động từ 12,43 - 13,89 mg g^{-1} khối lượng khô, cao hơn so với hàm lượng GB tích lũy của cây đối chứng (9,88 mg g^{-1} KLK). Như vậy, trong điều kiện bất lợi về nhiệt độ, độ ẩm và nước, các dòng thuốc lá chuyển gen đã sống sót và phát triển bằng cách tích luỹ hàm lượng GB cao hơn so với cây thuốc lá không chuyển gen. Kết quả biểu hiện gen *codA* ở cây thuốc lá đạt hiệu suất chuyển gen 42,64 - 54,23% là cơ sở để phân tích biểu hiện gen *codA* ở đối tượng cây trồng khác.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5205

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

1. Giới thiệu

Biến đổi khí hậu đang diễn ra trên quy mô toàn cầu dẫn tới tình trạng hạn hán, đặc biệt là hạn mặn ngày càng kéo dài, gây khó khăn lớn cho ngành sản xuất nông nghiệp. Bên cạnh đó, do biến đổi khí hậu mà diện tích đất sản suất nông nghiệp bị thu hẹp, gia tăng sự suy thoái đất, xói mòn rửa trôi, thường xuyên khan hiếm về nguồn nước. Vì vậy, việc chọn tạo giống các cây trồng có khả năng chịu hạn nhằm ứng phó với những tác động của biến đổi khí hậu là vấn đề mang tính cấp thiết và thời sự. Một trong các hướng nghiên cứu tiếp cận cơ chế chống chịu hạn hiện nay chính là làm gia tăng hàm lượng các chất thẩm thấu và tăng khả năng giữ nước của tế bào, trong đó, glycine betaine (GB) là một trong những chất bảo vệ thẩm thấu được nghiên cứu rộng rãi. Trong số các con đường sinh tổng hợp GB ở các đối tượng sinh vật khác nhau, con đường sinh tổng hợp GB từ tiền chất choline xúc tác bởi choline oxidase được mã hóa bởi gen *codA* là có hiệu quả và đơn giản nhất [1]. Phương pháp chuyển gen *codA* từ *Arthrobacter globiformis* vào các loại cây trồng để cải thiện khả năng chống chịu các stress phi sinh học đã được chứng minh là đơn giản và hiệu quả [2]-[4]. Tại Việt Nam, gen *codA* đã được chuyển thành công vào cây xoan và một số cây trồng khác [5]-[7] và các cây biến nạp gen được chọn tạo có khả năng chịu hạn, chịu mặn hơn so với các cây không chuyển gen. Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu này trình bày đặc điểm cấu trúc và hoạt động của một số cấu trúc chuyển gen mang gen *codA* đã được thiết kế. Kết quả phát triển vector chuyển gen *codA* là cơ sở ứng dụng cho biến nạp gen trên một số đối tượng cây nông nghiệp Việt Nam, đặc biệt là cây đậu tương.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Gen *codA* có kích thước 1904 bp, chứa đoạn nucleotide mã hóa peptid cmyc và chứa điểm cắt của *Xba*I và *Sac*I. Vector *pIBTII*, *pCAMBIA-HSP-codA*, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-Rd29-codA*, chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α và *Agrobacterum tumefaciens* C58, mồi *CodA F/R*. Vector *pIBTII* chứa gen *bar* mã hóa cho Phosphinothricin N-acetyltransferase, giống thuốc lá K326 *in vitro* đã phát triển được 3 - 4 lá thật được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm biến nạp gen.

2.2. Phương pháp

Tạo vector biểu hiện gen thực vật bằng việc tạo cấu trúc chuyển gen, lai ghép và tạo vector tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn theo phương pháp xung điện của Cohen và cộng sự (1972) [8]. DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi *codA-F/R*. Sản phẩm tinh sạch được cắt bởi *HindIII* và *Eco*RI, sau đó được thu hồi bằng phương pháp thôi gel. Phân đoạn của *pIBTII* và phân đoạn của *35S-codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* được ghép nối bằng ligase và được biến nạp vào *E.coli* để nhân dòng và kiểm tra vector tái tổ hợp.

Biến nạp cấu trúc vector mang gen chuyển *codA* vào cây thuốc là giống K326 theo phương pháp của Topping (1998) [9]. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *codA* trong thuốc lá biến nạp bằng PCR với các cặp mồi *codA*-F/R, *Bar*-F/R và F/TP-XbaI, R/cmyc-SacI thể hiện trong bảng 1.

Đánh giá khả năng chịu hạn nhân tạo *in vitro* bằng polyethylene glycol (PEG).

Bảng 1. *Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR sử dụng trong nghiên cứu*

Tên	Trình tự nucleotide	Kích thước dự kiến (bp)
codA-F/R	GTGTTGCAGTTGGATCGTTG CCTACACCTGGAGAGTCAA	~750
Bar-F/R	AAACCCACGTCATGCCAGTT GACAAGCACGGTCAACTTCC	~400
F/TP-XbaI R/cmyc-SacI	GCTCTAGAATGGCACAAATTAACA CGAGCTCTCAATTCAGATCCTCTTC	1904

Phân tích hàm lượng GB trong cây thuốc chuyển gen: Lá của các cây thuốc lá chuyển gen sau khi gây hạn nhân tạo được thu thập và đánh giá hàm lượng GB tích lũy theo phương pháp của Grieve và cộng sự (1983) [10].

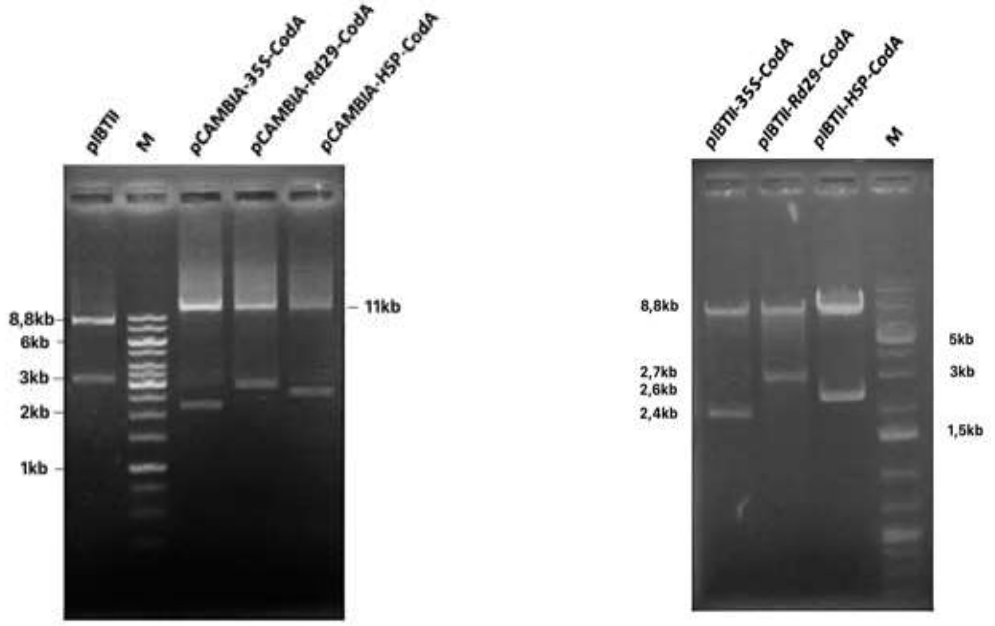
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo cấu trúc chuyển gen và A.tumefaciens tái tổ hợp mang gen codA

Các vector biểu hiện gen thực vật *pBTII* mang promoter *35S, rd29A và HSP* tương ứng để điều khiển biểu hiện gen *codA* ở cây đậu tương đã được thiết kế gồm hai bước: tạo cấu trúc mang gen *codA* và gắn cấu trúc mang gen *codA* đã thiết kế vào vector chuyển gen.

Mở vòng vector chuyển gen pIBTII và thu nhận cấu trúc mang gen chuyển codA

Sau khi tiến hành tách chiết và tinh sạch, các vector *pIBTII* và *pCAMBIA-HSP-codA, pCAMBIA-35S-codA, pCAMBIA-rd29A-codA* được cắt bằng hai enzyme *hind*III *và Eco*RI. Cấu trúc và kích thước của vector *pIBTII* và vector *pCAMBIA* mang gen chuyển *codA* được thể hiện trong hình 1A.



A **B**

Hình 1. *Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt vector pIBTII và pCAMBIA bằng enzyme HindIII và EcoRI (A) và cắt kiểm tra plasmid pIBTII mang các cấu trúc gen thiết kế (B)*

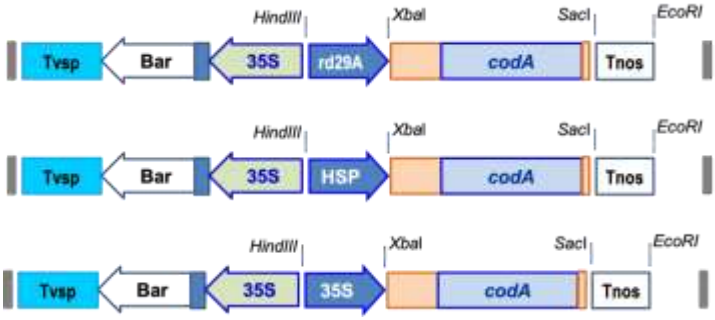
Kết quả phân tích hình ảnh điện di ở hình 1A cho thấy, các plasmid đã bị cắt hoàn toàn thành hai băng đúng với kích thước lý thuyết. Vector *pIBTII* bị cắt thành hai băng 8,8 kb và 3 kb; các vector *pCAMBIA-35S-codA, pCAMBIA-rd29A-codA, pCAMBIA-HSP-codA* bị cắt thành các băng có kích thước khoảng 11 kb và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb tương ứng với kích thước của *pCAMBIA* và cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA, Rd29A-codA, HSP-codA.*

Gắn cấu trúc mang gen chuyển codA vào vector chuyển gen pIBTII

Phân đoạn của vector chuyển gen *pIBTII* và phân đoạn của cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA, rd29A-codA, HSP-codA* được ghép nối với nhau bằng phản ứng T4 ligase. Sản phẩm ligase được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng sốc nhiệt. Kiểm tra colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *codA-F/codA-R* để lựa chọn dòng *E. coli* DH5α mang vector chuyển gen *codA*. Kết quả điện di cho thấy, 7 dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều dương tính với colony-PCR, băng điện di thu được có kích thước 1,9 kb tương ứng với kích thước của vector chuyển gen *codA* đã tính toán. Như vậy, vector chuyển gen *codA* đã tồn tại trong tế bào vi khuẩn *E. coli.*

Để xác thực thêm độ chính xác của vector mới thiết kế, lấy ngẫu nhiên ba dòng khuẩn lạc dương tính chứa vector *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29A-codA* tương ứng nuôi lỏng và tách plasmid. Plasmid được cắt với enzyme *HindIII* và *EcoRI*. Sản phẩm cắt được điện di và chụp ảnh thể hiện trong hình 1B cho thấy, xuất hiện hai băng gần với băng 8,8 kb của pIBTII và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb của *pCAMBIA-35S-codA, pCAMBIA-rd29A-codA, pCAMBIA-HSP-codA* chứng tỏ các dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều mang vector cần thiết kế. Toàn bộ 7 dòng khuẩn lạc dương tính này được nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc spectinomycine để nhân dòng vector tái tổ hợp cho biến nạp vào *A.tumefaciens* phục vụ chuyển gen.

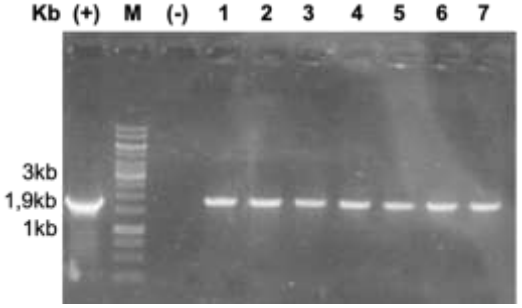
Cấu trúc của vector chuyển gen vector *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29A-codA* được mô tả ở hình 2.



Hình 2. *Sơ đồ của các vector pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29-codA*
Tvsp: Terminator from soybean vegetative storage protein gene, Tnos: NOS terminator

Tạo chủng A. tumefaciens C58 chứa vector chuyển gen codA

Các plasmid chứa vector chuyển gen *codA* tách chiết từ các dòng vi khuẩn *E. coli* dương tính với colony-PCR được tinh sạch, sau đó được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 bằng phương pháp xung điện. Sau khi biến nạp, dịch khuẩn được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh spectinomycine 50 mg/l và rifamicine 50 mg/l, nuôi ở 28^{o}C trong 48 giờ. Kết quả biến nạp cho thấy, nhiều dòng khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường có kháng sinh chọn lọc. Khuẩn lạc được sàng lọc, kiểm tra lại bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho gen *codA*. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 loại vector chuyển gen được thể hiện trong hình 3. Trên hình 3 có một băng duy nhất kích thước 1,9 kb tương ứng với băng đối chứng dương và đúng với kích thước của đoạn DNA chứa gen *codA*. Như vậy, ba vector chuyển gen *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29A-codA* đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58. Các dòng khuẩn với ba cấu trúc chuyển gen khác nhau này được bảo quản sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.

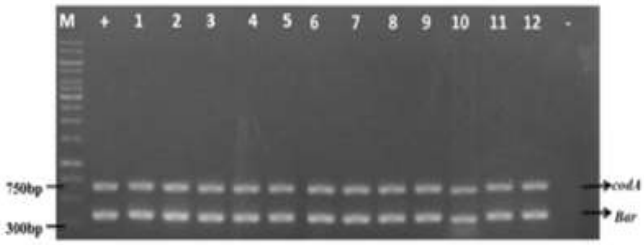


Hình 3. *Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn A. tumefaciens C58 mang các cấu trúc gen thiết kế*
M: marker 1 kb, giếng (+): plasmid, giếng(-): H_2O, giếng 1 -2: khuẩn mang cấu trúc pIBTII-35S-codA, giếng 3-5: khuẩn mang cấu trúc pIBTII-rd29A-codA, giếng 6- 7: khuẩn mang cấu trúc pIBTII-HSP-codA

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

Tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua A. tumefaciens

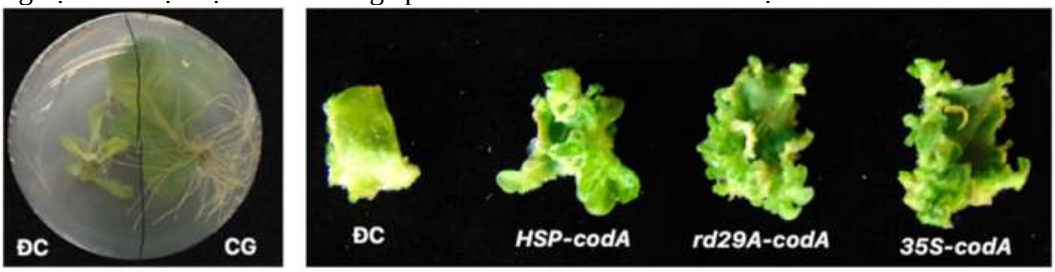
Các cấu trúc mang gen *codA* được biến nạp vào mô lá thuốc lá giống K326 và đánh giá hiệu quả chọn lọc của gen *bar*. Kết quả thí nghiệm biến nạp cho thấy, tỷ lệ số chồi tái sinh sau khi chuyển gen và chọn lọc cao ở cả ba cấu trúc *pIBTII-HSP-codA, pIBTII-35S-codA, pIBTII-rd29A-codA* đạt 88%, 90%, 92% tương ứng và các chồi của 3 cấu trúc có tỷ lệ sống sót trên môi trường tạo rễ có bổ sung phosphinothricin từ 42,64 - 54,23%. Ngược lại, các mảnh lá đối chứng có tỷ lệ phát sinh chồi chỉ đạt 27%, các chồi nhỏ và chết vàng sau 2 tuần biến nạp. Các dòng thuốc lá chuyển gen sống sót sau chọn lọc bằng phosphinothrcin được ra cây bằng giá thể trong điều kiện nhà lưới. Sau 30 ngày, lá non được thu mẫu, tách chiết DNA tổng số và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *codA* bằng phương pháp PCR với 2 cặp mồi *codA* F/R và bar F/R, kết quả được thể hiện ở hình 4. Kết quả phân tích hình 4 cho thấy, băng điện di có kích thước khoảng 750 bp và 400 bp phù hợp với kích thước của đoạn gen *codA* và gen *bar*.



Hình 4. *Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá chuyển gen.*
M: marker 1 kb, giếng (+): plasmid mang cấu trúc chuyển gen, giếng 1 -5: các dòng chuyển gen cấu trúc rd29A-codA, giếng 6 - 9: các dòng chuyển gen cấu trúc 35S-codA, giếng 10-12: các dòng chuyển gen cấu trúc HSP-codA, giếng(-): cây không chuyển gen

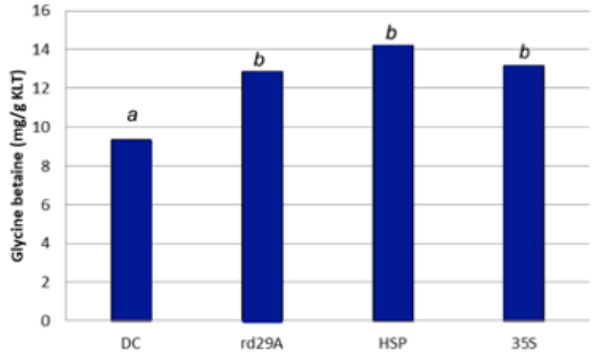
Kết quả đánh giá và phân tích các dòng thuốc lá chuyển gen

Các dòng thuốc lá chuyển gen tiếp tục gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% *in vitro* nhằm bước đầu đánh giá sự hoạt động của gen *codA* trong cây thuốc lá chuyển gen. Riêng đối với các chồi và các mảnh thuốc lá chứa vector chuyển gen *HSP-codA* được điều khiển bởi promoter *HSP* là promoter cảm ứng nhiệt nên các mảnh lá và chồi được tiến hành sốc nhiệt ở 37ºC trong thời gian 3 ngày. Ở giai đoạn gây hạn 7 ngày và 14 ngày, các mảnh lá của thuốc lá chuyển gen đều xanh và tạo chồi còn các mảnh lá của cây đối chứng chuyển màu vàng và tạo chồi rất ít. Các chồi thuốc lá chuyển gen được chuyển sang môi trường chịu hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% và cho tỷ lệ tạo rễ trung bình trên 96% sau 10 ngày cấy chuyển và các chồi cây đối chứng tạo rễ ít hoặc không tạo rễ, cây còi cọc không phát triển được (Hình 5). Kết quả cho thấy, các cây thuốc lá chuyển gen ở trong môi trường hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% có khả năng duy trì áp suất thẩm thấu, phát triển mạnh bộ rễ để tăng cường sức chống chịu, các cây đối chứng trong môi trường hạn nhân tạo bị mất cân bằng áp suất thẩm thấu dẫn đến còi cọc và chết.



Hình 5. *Kết quả gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% các dòng thuốc lá chuyển gen. (A) chồi tạo rễ trên môi trường hạn sinh lý; B) các mảnh lá tạo chồi trên môi trường hạn sinh lý (ĐC: Đối chứng, CG: Chuyển gen)*

Tiến hành thí nghiệm gây hạn nhân tạo cho các dòng cây chuyển gen được thực hiện trong buồng sinh trưởng ở 37°C, độ ẩm 55% và hoàn toàn không tưới nước trong suốt thời gian thí nghiệm. Kết quả đánh giá kiểu hình sau 7 ngày thí nghiệm cho thấy, các dòng thuốc lá chuyển gen vẫn sinh trưởng tốt, trong khi các cây đối chứng héo sau ngày thứ 3 gây hạn và chết hoàn toàn sau 7 ngày gây hạn. Kết quả định lượng GB tích lũy trong điều kiện hạn ở hình 6 cho thấy, trong cùng điều kiện xử lý hạn, các cây chuyển gen *codA* mang các vector chuyển gen điều khiển bởi các promoter cảm ứng khác nhau sẽ cho kết quả tích lũy hàm lượng GB khác nhau. Cây chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn so với cây đối chứng, cụ thể lượng GB tích lũy trung bình của các cây chuyển gen dòng *rd29A-codA*, *HSP-codA*, *35S-codA* lần lượt là 12,43 mg/g khối lượng khô (mg/g KLK), 13,89 mg/g KLK, 12,89 mg/g KLK, so với hàm lượng GB tích lũy của cây đối chứng là 9,88 mg/g KLK.



Hình 6. *Kết quả định lượng hàm lượng GB trong thuốc lá chuyển gen*
(Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở P<0,05)

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

3.3. Thảo luận

Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của kỹ thuật tạo cây chuyển gen là khâu thiết kế vector biểu hiện với cấu trúc hoàn chỉnh và phù hợp với tế bào cây chủ. Sự biểu hiện của gen chuyển trong thực vật chuyển gen được kiểm soát thông qua hoạt động của promoter (trình tự khởi động) và terminator (yếu tố kết thúc). Trong nghiên cứu này, promoter *35S*, *HSP*, *rd29A* được lựa chọn và là thành phần của cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* trong vector chuyển gen *pIBTII*. Trong điều kiện khô hạn, sự hoạt động mạnh của ba loại vector này sẽ giúp gen chuyển *codA* khởi động phiên mã tổng hợp choline oxidase, enzyme chìa khoá xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp GB từ choline trong cây đậu tương chuyển gen. Sự tích luỹ hàm lượng GB trong cây đậu tương chuyển gen giúp điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào, giảm stress oxy hoá, từ đó tăng cường khả năng chống chịu hạn ở cây đậu tương chuyển gen *codA*.

Một quy trình biến nạp gen hiệu quả không thể thiếu sự lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả để phân biệt giữa tế bào chuyển gen và không chuyển gen. Các gen kháng thuốc kháng sinh hoặc kháng thuốc diệt cỏ thường được lựa chọn và sử dụng cho mục đích này. Ở thực vật, các gen kháng thuốc diệt cỏ thường được mã hoá cho một protein tái tổ hợp không mẫn cảm với thuốc diệt cỏ hoặc một loại enzyme có thể khử độc tố của chất diệt cỏ. PPT là một loại thuốc diệt cỏ

không chọn lọc, ức chế hoạt động của glutamine synthetase cùng hai gốc L-alanin gây ra sự tích tụ quá mức amoniac ở thực vật bậc cao [11]. Gen chỉ thị chọn lọc *bar* có khả năng kháng thuốc diệt cỏ PPT [12]. Gen *bar* đã được sử dụng rộng rãi và là chỉ thị lý tưởng để xác định các mô chuyển gen đã được sử dụng trong vector chuyển gen *codA*. So với việc sử dụng kháng sinh làm chất chọn lọc, nghiên cứu này cho thấy việc sử dụng PPT làm chất chọn lọc cho thấy hiệu quả chọn lọc cao hơn. Ở giai đoạn mô sẹo, kanamycin dường như kém hiệu quả hơn PPT trong việc ức chế sự phát triển của các mô sẹo không biến nạp [11].

Thực vật chuyển gen *bar* có khả năng kháng lại chất diệt cỏ cả trong nhà kính và điều kiện đồng ruộng. Vì vậy, gen *bar* có thể được sử dụng để sàng lọc các thế hệ của dòng chuyển gen trong chọn tạo giống cây trồng. Khả năng kháng thuốc diệt cỏ của gen *bar* có thể được theo dõi bằng cách phun PPT trực tiếp lên cây con hoặc bôi PPT cục bộ lên lá. Ngoài ra, để phát hiện và định lượng protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen bằng kỹ thuật Western blot, cấu trúc mang gen chuyển *codA* còn được gắn thêm đoạn DNA mã hóa kháng nguyên cmyc - một lựa chọn phổ biến, kinh tế và hiệu quả của nhiều nghiên cứu hiện nay [13].

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) là cây mô hình, được sử dụng để đánh giá hoạt động của vector chuyển gen thực vật và xây dựng quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* [14]-[18]. Trong nghiên cứu này, hoạt động của vector biểu hiện mang gen *codA* đã được đánh giá trong điều kiện hạn sinh lý. Kết quả biểu hiện gen *codA* ở cây thuốc lá đạt hiệu suất chuyển gen từ 42,64 - 54,23% là cơ sở cho chuyển gen *codA* vào các cây trồng đích.

4. Kết luận

Ba vector chuyển gen *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* và *pIBTII-HSP-codA* mang gen *codA* mã hóa choline oxidase, dưới sự điều khiển lần lượt bởi 3 promoter cảm ứng khác nhau: *35S*, *rd29A* và *HSP* đã được thiết kế và biến nạp thành công vào cây thuốc lá. Trong điều kiện bất lợi về nhiệt độ, độ ẩm và nước, các dòng thuốc lá chuyển gen đã sống sót và phát triển bằng cách tích luỹ hàm lượng glycine betain cao hơn so với cây thuốc lá không chuyển gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] A. Sakamoto and N. Murata, "The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgeneic plants," *Plant Cell Environ*, vol. 25, pp. 163-171, 2002.

[2] A. Baloda and S. Madanpotra, "Transformation of mungbean plants for salt and drought tolerance by introducing a gene for an osmoprotectant glycine betaine," *Journal of Plant Stress Physiology*, vol. 3, pp. 5-11, 2017.

[3] Y. J. Cheng, X. P. Deng, S. S. Kwak, W. Chen, and A. E. Eneji, "Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing choline oxidase in chloroplasts against water stress," *Botanical Studies*, vol. 54, no. 1, p. 30, 2013.

[4] D. Wei, W. Zhang, C. Wang, Q. Meng, G. Li, T. H. H. Chen, and X. Yang, "Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to alleviate salt-induced potassium efflux and enhances salt tolerance in tomato plants," *Plant Science*, vol. 257, pp. 74-83, 2017.

[5] H. H. Chu and V. T. Bui, "Salt tolerance of *Melia azedarach* plant transgenic codA encoding coline oxidase biosynthesis of glyxin-betain," *Journal of Agriculture & Rural Development*, vol. 18, pp. 163-168, 2017.

[6] V. T. Bui, V. S. Le, and H. H. Chu, "Transformation of coda gene encoding choline oxidase into *Melia azedarach* L. enhances drought tolerance," *Journal of forestry science and technology*, vol. 2, pp. 3-10, 2013.

[7] T. T. H. Bui, H. G. Dong, M. D. Ngo, B. N. Pham, and H. H. Chu, "Evaluation of recombinant expression of *codA* gene regulated by *rd29A* promoter in tobacco," *Journal of forestry science and technology*, vol. 8, pp. 13-20, 2019.

[8] S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, and L. Hsu, "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA," Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 69, 2110, 1972.

[9] J. S. Topping, "Tobacco transformation. Methods of molecular biology," *Plant virology protocols*, vol.

81, pp. 365- 372, 1998.
[10] C. M. Grieve and S. R. Granttan, "Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds," *Plant and Soil*, vol. 70, pp. 303-307, 1983.
[11] L. D'Halluin, M. De Block, J. Denecke, J. Janssens, J. Leemans, A. Reynaerts, and J. Botterman, *The bar Gene as Selectable and Screenable Marker in Plant Engineering*, in Recombinant DNA Methodology II, Elsevier, 1995, pp. 157-168.
[12] H. Liang, P. A. Kumar, V. Nain, W. A. Powell, and J. E. Carlson, *Selection and screening strategies*, in Transgenic Crop Plants, Springer, 2010, pp. 85-143.
[13] X. Zhao, G. Li, and S. Liang, "Several affinity tags commonly used in chromatographic purification," *Journal of analytical methods in chemistry*, vol. 2013, pp. 1-8, 2013.
[14] T. Ganapathi, P. Suprasanna, P. Rao, and V. Bapat, "Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 171-184, 2004.
[15] 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," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 58, pp. 651-657, 2015.
[16] T. S. Lo, H. D. Le, V. T. T. Nguyen, H. H. Chu, L. V. Son, and H. M. Chu, **"**Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improvesdrought tolerance in transgenic tobacco," *Turkish Journal of Botany*, vol. 39, no. 6, pp. 988-995, 2015.
[17] T. M. T. Lo, T. X. T. Vi, H. D. Le, V. S. Le, H. H. Chu, and H. M. Chu, "RNAi-mediated resistance to SMV and BYMV in transgenic tobacco," *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, vol. 16, pp. 213-218, 2016.
[18] T. Q. Tu, P. Vaciaxa, T. T. M. Lo, N. H. Nguyen, N. T. T. Pham, Q. H. Nguyen, P. T. Do, T. N. N. Nguyen, Y. T. H Nguyen, and M. H. Chu, "GmDREB6, a soybean transcription factor, notably affects the transcription of the NtP5CS and NtCLC genes in transgenic tobacco under salt stress conditions," *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.018.