

PHÂN LẬP GEN NHÂN TỐ PHIÊN MÃ *DREB3* CỦA ĐẬU TƯƠNG VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT ĐỘNG CỦA CẤU TRÚC *rd29A::DREB3* TRÊN CÂY THUỐC LÁ CHUYÊN GEN

Bành Thị Mai Anh¹, Lê Thu Ngọc², Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà²

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

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

Ngày nhận bài: 28.2.2014

Ngày nhận đăng: 24.4.2014

TÓM TẮT

Các yếu tố bất lợi của môi trường hiện đang là những thách thức lớn cho mục tiêu duy trì sự phát triển bền vững của việc sản xuất lương thực cho con người, trong đó hạn và mặn là hai trong số những nhân tố quan trọng nhất kìm hãm sự phát triển sản xuất nông nghiệp. Những hướng nghiên cứu về stress ở thực vật hiện nay đang tập trung vào việc phân lập và nghiên cứu đặc tính một số gen liên quan đến tác động bất lợi của môi trường. *DREB3* là yếu tố điều khiển quá trình phiên mã của các gen liên quan đến tình chịu hạn của cây trồng. Trong nghiên cứu này, gen *DREB3* được phân lập từ cDNA của cây đậu tương bằng cách sử dụng các đầu mút đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự mã số DQ055133.1. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy gen *DREB3* phân lập được có trình tự tương đồng 100% với trình tự gen *DREB3* đã công bố trên ngân hàng GenBank. Dựa trên phân tích cấu trúc protein suy diễn của *DREB3*, chúng tôi đã xác định được vùng cấu trúc bảo thủ AP2 của phân họ gen *DREB* từ vị trí amino acid 138 đến 197. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên cấu trúc vùng AP2 cho thấy gen *DREB3* thuộc nhóm A₆ trong phân họ gen *DREB*. Với mục đích tạo cây trồng chịu hạn, gen *DREB3* đã phân lập được nối ghép vào vector chuyển gen pBI1101::*rd29A* và được điều khiển bởi promoter cảm ứng hạn *rd29A*. Cấu trúc này được đưa vào cây thuốc lá để tạo cây thuốc lá chuyển gen chịu hạn thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả xử lý hạn 21 đồng chỉ chuyển gen cho thấy các dòng chuyển gen được tăng cường khả năng chịu hạn và phục hồi so với cây đối chứng.

Từ khóa: đậu tương, gen *DREB3*, khả năng chịu hạn, promoter *rd29A*, thuốc lá

MỞ ĐẦU

Trong các điều kiện môi trường bất lợi, hạn là một trong những yếu tố quan trọng nhất có thể giới hạn phân bố địa lý của thực vật, hạn chế sinh trưởng và năng suất của các loài kinh tế quan trọng. Hạn làm giảm tình trạng nước trong tế bào thực vật và gây tổn thương cho cây, có thể dẫn đến chết cây. Ở mức độ phân tử, điều kiện hạn sẽ làm cho một số gen được tăng hoạt động và một số khác bị giảm hoạt động trong cây bị stress hạn.

DREB (Dehydration responsive element binding) là một lớp các nhân tố phiên mã thuộc họ nhân tố phiên mã AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) liên quan đến sự đáp ứng của thực vật với điều kiện hạn, mặn, lạnh cũng như các stress môi trường khác. Những nghiên cứu về cấu trúc đã chỉ ra rằng các nhân tố *DREB* bao gồm một vùng bảo thủ AP2/ERF gồm khoảng 60 amino acid cho phép chúng tương tác với một loạt các gen phía sau theo các con đường không phụ thuộc ABA (Agarwal *et*

al., 2006; Zhang *et al.*, 2009). Thông qua đặc điểm cấu trúc của các nhân tố phiên mã *DREB*, phân họ *DREB* có thể được chia thành 6 phân nhóm từ A₁ đến A₆ (Amudha, Balasubramani, 2011; Chen *et al.*, 2009); các thành viên *DREB* của các phân nhóm khác nhau giữ nhiều vai trò ở thực vật. Kết quả đối chiếu trình tự amino acid của các protein *DREB* thuộc nhiều loài thực vật khác nhau cho thấy có sự tương đồng cao ở vùng trung tâm AP2/EREBP (APETALA2/Ethylene Response Elements Binding Proteins) Trong khi đó, cả vùng đầu N và vùng đầu C đều có sự tương đồng rất thấp. Các phân nhóm của protein *DREB*, ngoại trừ A₄ và A₅, đều có một trình tự bảo thủ cao ở cuối chuỗi protein, đó là LWSY (A₁), GDDGFSFLxY (A₂), GSIWDxxDPFF (A₃) và KYPsxEIDW (A₆) (Agarwal *et al.*, 2006). Trung tâm của các nhân tố phiên mã *DREB* có một vùng bảo thủ giàu Ser/Thr tiếp giáp với vùng chức năng gắn DNA AP2/EREBP gồm 3 dài β và 1 dài xoắn ốc α chạy song song. Vùng này có thể bị phosphoryl hóa dưới điều kiện mất nước (Zhou, Ma, 2010). Các nhân tố phiên mã *DREB* có thể xác định và gắn với

yếu tố hoạt động *cis* CRT/DRE (C repeat/Dehydration responsive element) (A/GCCGAC) trong các promoter và điều hòa sự biểu hiện của các gen liên quan đến stress môi trường ở thực vật bậc cao (Sakuma et al., 2002).

Gen *DREB3* là một trong 10 thành viên thuộc phân họ gen mã hóa các yếu tố phiên mã *DREB* đã được phát hiện trong hệ gen đậu tương. Hoạt động của gen *DREB3* được cảm ứng bởi nhiệt độ cao và hoạt hóa sự biểu hiện của rất nhiều gen đáp ứng với điều kiện stress hạn. Gen này đồng thời cũng liên quan đến con đường đáp ứng với stress lạnh không phụ thuộc ABA. Các phân tích sâu hơn về trình tự promoter đã làm sáng tỏ sự điều biến của gen *DREB3* khi được cảm ứng bởi điều kiện lạnh. Một số nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện quá mức của gen *DREB3* giúp tăng cường khả năng chống chịu với các stress lạnh, hạn và mặn của cây *Arabidopsis* chuyển gen (Nasreen et al., 2013). Nhằm tạo tiền đề cho hướng nghiên cứu chọn tạo các giống cây trồng chịu hạn, chúng tôi tiến hành tách dòng gen mã hóa nhân tố phiên mã *DREB3* của đậu tương và bước đầu đánh giá hoạt động của cấu trúc gen *rd29A::DREB3* của cây thuốc lá chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống đậu tương Nâu Cao Bằng do Trung tâm Nghiên cứu và phát triển đầu đở cung cấp. Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, vector tách dòng pBT, vector chuyển gen pBI101 mang promoter cảm ứng hạn *rd29A* (ki hiệu: pBI101::*rd29A*), chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2260 do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Phân lập và tách dòng gen *DREB3*

RNA tổng số từ lá cây đậu tương được tách chiết bằng phương pháp của Chomczynski, Mackey (1995). RNA tổng số sau khi tách chiết được sử dụng là nguyên liệu để khuếch đại gen *DREB3* bằng kỹ thuật RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *DREB3*.for AGAGGATCCATGGCAGCTTTGATGGATTTT AC và *DREB3*.rev CGGGAGCTCATTCAA

AGAGGAGGAGCAGCTT được thiết kế dựa trên trình tự gen *DREB3* (DQ055133.1). Gen *DREB3* sau khi phân lập được nối ghép vào vector tách dòng

pBT và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Vector tái tổ hợp pBT/*DREB3* đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế *Bam*HI được sử dụng làm nguyên liệu để giải trình tự gen bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ kit Big Dye Terminator v.3.2 Cycle Sequencing. Trình tự của gen *DREB3* phân lập được so sánh với trình tự của các gen thuộc họ *DREB* đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST và thiết lập sơ đồ cây phát sinh trên phần mềm Cobalt.

Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc *rd29A::DREB3*

Đoạn gen *DREB3* đã phân lập được nối ghép vào vector pBI101::*rd29A* tạo thành vector chuyển gen mang cấu trúc *rd29A::DREB3*. Trong thí nghiệm này, hai enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I được sử dụng để xử lý tạo đầu so le cho đoạn gen *DREB3* và loại bỏ gen *GUS* của vector pBI101::*rd29A* làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép gen nhờ sự xúc tác của enzyme T4-DNA ligase. Sản phẩm lai được biến nạp vào *E.coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Vector chuyển gen tái tổ hợp pBI101::*rd29A::DREB3* sau khi được kiểm tra bằng cách cắt enzyme hạn chế được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* C58/pGV2260 bằng phương pháp xung điện phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

Phương pháp chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

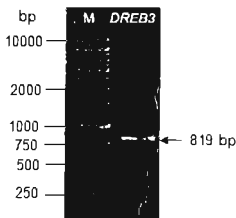
Quy trình chuyển gen *DREB3* vào giống thuốc lá *N. tabacum* K326 thông qua *Agrobacterium* được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) có cải tiến. Mảnh lá thuốc lá có diện tích 1cm² được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen pBI101::*rd29A::DREB3* có OD₆₀₀ = 0,7 trong khoảng 10-20 phút và được đặt lên môi trường tạo ứ chồi MS+1 mg/l BAP. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, chuyển mảnh lá sang môi trường chọn lọc MS+1 mg/l BAP có bổ sung kháng sinh cefotaxim 500 mg/l và kanamycine 50 mg/l. Sau 5 - 6 tuần, các chồi phát triển tốt được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ MS + 0,1 mg/l NAA. Sau 3 - 4 tuần cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3-4 lá thật sẵn sàng cho ra bầu bầu: cát (1:1). Cây phát triển với 4-5 lá thật thì chuyển ra trồng trong bầu chứa giá thể dưới điều kiện nhà kính.

Đánh giá tính chịu hạn của các dòng thuốc lá chuyển gen

Các dòng thuốc lá chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR để xác định sự có mặt của cấu trúc gen chuyển *rd29A::DREB3*. Việc đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các dòng thuốc lá chuyển gen ở giai đoạn cây non được tiến hành theo phương pháp của Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998). Các dòng cây dương tính được xử lý khô hạn mất nước trong 10 ngày, sau đó sẽ được tưới nước phục hồi. Sau 10 ngày kiểm tra khả năng chịu hạn và phục hồi bằng sự sinh trưởng và phát triển của cây.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập, tách dòng và xác định trình tự gen *DREB3*



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *DREB3*, M Thang DNA chuẩn 1kb, Fermentas.

Sử dụng phần mềm DNASTar và trình tự gen *DREB3* khai thác trên ngân hàng gen quốc tế với mã số DQ055133.1, chúng tôi đã thiết kế một cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại gen *DREB3*, trong đó, trình tự mồi xuôi và mồi ngược được bổ sung thêm vị trí nhận biết của enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I, theo thứ tự tương ứng, để phục vụ cho việc thiết kế vector sau này. Mẫu lá của cây đậu tương giống Nâu Cao Bằng bị gây hạn nhân tạo được thu thập để tách chiết RNA tổng số làm nguyên liệu để khuếch đại gen *DREB3* bằng phương pháp RT-PCR. Để đảm bảo độ chính xác cao trong quá trình tổng hợp gen chúng tôi sử dụng *Pfu* DNA polymerase khi thực hiện phản ứng PCR. Ngoài hoạt tính 5'-3' polymerase xúc tác

cho quá trình polymer hóa các deoxiribonucleotide, enzyme này còn có khả năng đọc sửa (proofreading) nhờ hoạt tính 3'-5' exonuclease, giúp sửa chữa những sai hỏng trên sợi DNA mới tổng hợp. Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 1) cho thấy sản phẩm của phản ứng RT-PCR là một băng đặc hiệu với kích thước đúng như dự đoán là gần 1 kb, chứng tỏ chúng tôi đã phân lập thành công gen *DREB3*.

Đoạn gen *DREB3* sau khi khuếch đại thành công được tinh sạch và nối ghép vào vector tách dòng pBT và biến nạp và tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Kết quả sàng lọc các thể biến nạp trên đĩa LB chứa kháng sinh carbenicillin 50 mg/l bằng phương pháp PCR và cắt enzyme hạn chế cho phép khẳng định đoạn gen *DREB3* đã được dòng hóa thành công trong vector pBT (không công bố). Chúng tôi sử dụng các dòng này làm nguyên liệu để giải trình tự gen. Kết quả cho thấy gen *DREB3* đã phân lập có kích thước 819 bp, mã hóa 273 amino acid. So sánh BLAST trình tự gen *DREB3* và trình tự gen *DREB3* đã được công bố trên ngân hàng gen (mã số DQ055133.1) cho kết quả độ tương đồng giữa hai gen là 100%.

Khi phân tích trình tự amino acid của gen *DREB3* thu được, chúng tôi nhận thấy có vùng bảo thủ AP2, từ vị trí amino acid 137 đến 197. Vùng này hoàn toàn trùng khớp với vùng AP2 của gen *DREB3* trên ngân hàng gen quốc tế với cấu trúc 3 dài β và một dải xoắn ốc α (Hình 2), tương tự vùng AP2 của các gen khác thuộc họ AP2/ERF. Trong vùng AP2 của gen *DREB3* có sự xuất hiện của Valine ở vị trí 14 giống với tất cả các gen *DREB3* khác, và vị trí thứ 19 là Leucine thay vì là Glutamic acid, vị trí 37 là amino acid Alanine cũng khá bảo thủ. Các vị trí V₁₄, A₃₇ có vai trò quan trọng trong quá trình gắn với trình tự DNA đặc trưng trong quá trình phiên mã.

Dựa vào sự phân nhóm các protein thuộc họ AP2/ERF, chúng tôi tiến hành phân tích và so sánh vùng AP2 của gen *DREB3* thu được với các vùng AP2 của các gen thuộc họ AP2/ERF, làm cơ sở để thiết lập sơ đồ cây phát sinh trên phần mềm Cobalt với mức độ sai khác giữa các trình tự cao nhất là 0,85 (Hình 3). Kết quả phân tích cho thấy, gen *DREB3* có mối quan hệ gần với các gen *ZmDDBP1*, *GhDDBP2*, *GmDREBb*, thuộc cùng một nhánh với *GhDDBP2*. Các gen này được xếp vào nhóm A₆ của phân họ gen *DREB* (Enricco *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Như vậy, có thể kết luận rằng gen *DREB3* thu được là thuộc nhóm A₆ của phân họ gen *DREB*.

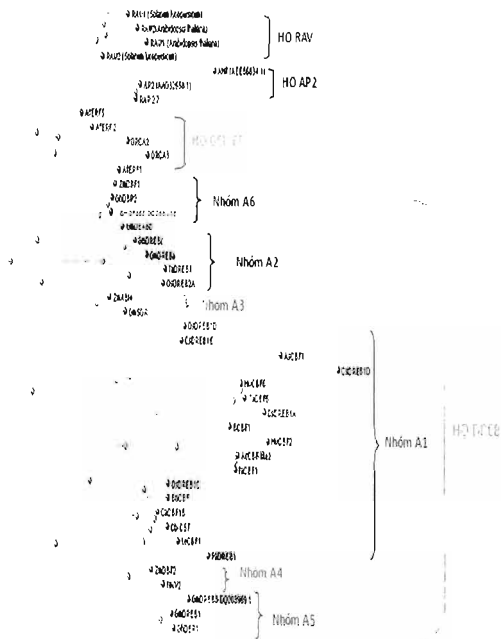
MAALMDFYSSSTEFQLHSDPFRGELMEVLEPFMKSPFSTPSPNSCFLSTSYPSPNNYSPS
 LYSNGLSSIPNTTQNLIIGFGQGQPTSLVGLNHLTPSQISQIQAQIQIQNHSNTLSFLGPKPIP
 MKHVGMPPKPT

\rightarrow KLYRGVRQRHWGKVVAEIRLPKNRTRIMWLGTFDTAEEAALAYDKAAYKLRGDFARLN
 Dải β_1 Dải β_2 Dải β_3 * * * * * Dải xoắn α

FPN \rightarrow

LRHQSSVGGDFGEYKPLHSADVAKLQAICEGLAELQKQGKTEKPPRKTRSKLASPPEN
 DNNNDNNSCKVEAAPL

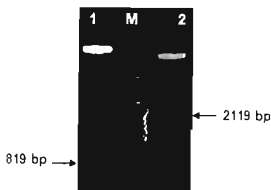
Hình 2. Kết quả phân tích trình tự amino acid của protein *DREB3*



Hình 3. Phân tích cây phả hệ các gen họ AP2/ERF sử dụng phần mềm Cobalt.

Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc *rd29A::DREB3*

Như đã trình bày ở trên, do trong quá trình thiết kế các mối được gắn thêm điểm cắt của enzyme hạn chế nên gen *DREB3* sau khi được đồng hòa ở hai đầu sẽ mang trình tự nhận biết của cặp enzyme *Bam*HI và *Sac*I. Điều này tạo thuận lợi cho việc cắt nối gen trong thí nghiệm tiếp theo. Theo đó, các vector pBT/*DREB3* và pBI101::*rd29A* được xử lý đồng thời bằng cặp enzyme *Bam*HI và *Sac*I. Đoạn gen *DREB3* và vector pBI101::*rd29A* đã loại bỏ gen *GUS* sau khi tinh sạch được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng nối ghép dưới sự xúc tác của enzyme T4-DNA ligase tạo thành vector tái tổ hợp pBI101::*rd29A::DREB3* và được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Vector tái tổ hợp này được khẳng định bằng phản ứng PCR nhân gen *DREB3* sử dụng mỗi đặc hiệu (không công bố) và cắt kiểm tra bằng hai cặp enzyme *Bam*III và *Sac*I và *Hin*dIII và *Sac*I.



Hình 4. Kết quả cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pBI101 *rd29A DREB3* bằng cặp enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I (1) và cặp enzyme *Hin*dIII và *Sac*I (2). M Thang DNA chuẩn 1kb, Fermentas

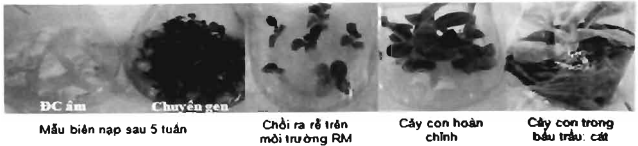
Kết quả điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 0,8% (Hình 4) cho thấy: phản ứng cắt bằng cặp enzyme *Bam*HI và *Sac*I cho hai băng DNA, trong đó một băng có kích thước hơn 800 bp tương ứng với kích thước của gen *DREB3*. Tương tự như vậy, sản phẩm của phản ứng cắt bằng *Hin*dIII và *Sac*I là hai băng DNA trong đó có một băng hơn 2100 bp, phù hợp với kích thước của cấu trúc *rd29A::DREB3*. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen pBI101::*rd29A::DREB3*. Vector này sau đó được biến nạp vào *A. tumefaciens* C58/pGV 2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho mục đích chuyển gen vào thực vật.

Chuyển gen *rd29A::DREB3* vào thuốc lá thông qua *Agrobacterium* và bước đầu đánh giá tính

chịu hạn của các dòng thuốc lá chuyển gen

Nhằm mục đích kiểm tra sự hoạt động của cấu trúc *rd29A::DREB3*, chúng tôi tiến hành chuyển cấu trúc này vào cây mô hình thuốc lá giống K326. Kết quả chuyển gen cho thấy, sau khoảng 3 tuần thì từ các mảnh lá biến nạp đã số đếm mọc lên các cụm chồi ở mép lá. Trong khi đó, mẫu đối chứng âm không chuyển gen, khi đặt trên môi trường có chứa kháng sinh chọn lọc đều bị chết dần đi và hầu hết không thấy hiện tượng mọc chồi (Hình 5). Tỷ lệ tạo đa chồi của các mẫu trong các đợt chuyển gen đạt khá cao, khoảng 83%. Từ các cụm chồi, chúng tôi chọn 135 cây chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc trong kháng sinh. Sau 4 tuần, chúng tôi thu được 129 cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3-4 lá thật sẵn sàng cho ra bầu trấu cát.

Từ các cây thu được, chúng tôi chọn ngẫu nhiên 40 dòng thuốc lá để phân tích PCR sử dụng các cặp mỗi đặc hiệu cho promoter *rd29A* và gen *DREB3* và thu được 21 dòng cây dương tính (không công bố). Tiếp đó, chúng tôi tiến hành xử lý hạn các dòng thuốc lá chuyển gen cho kết quả PCR dương tính nhằm đánh giá bước đầu sự hoạt động của gen chuyển *DREB3* dưới sự điều khiển của promoter *rd29A* trong cây thuốc lá chuyển gen giúp tăng cường khả năng chịu hạn của cây. Ở giai đoạn gây hạn 10 ngày, trong khi hầu hết các dòng cây chuyển gen là còn xanh, thì cây đối chứng đã héo. Kết quả cho thấy khả năng chịu hạn của cây chuyển gen được tăng cường hơn nhiều so với cây đối chứng. Tuy nhiên, mức độ chịu hạn ở các dòng thuốc lá chuyển gen có sự khác nhau, trong đó, dòng số 9 có khả năng chịu hạn tốt nhất. Điều này có thể do gen đích được chuyển vào các vị trí khác nhau của genome vật chủ dẫn đến mức độ biểu hiện của gen khác nhau. Ngoài ra, một nguyên nhân nữa cũng có thể dẫn tới hiện tượng các dòng chuyển gen có khả năng chịu hạn khác nhau là những dòng cây chỉ có duy nhất một bản copy của gen thì sẽ hoạt động mạnh hơn những dòng có nhiều bản copy, vì số lượng bản copy càng nhiều thì càng bị ức chế hoạt động. Sau khi tiến hành tưới nước trở lại 10 ngày, hầu hết các dòng thuốc lá đều tươi trở lại trong khi cây đối chứng thì không có khả năng phục hồi (Hình 6). Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây trên cây *Arabidopsis* chuyển gen *DREB3* (Chen *et al.*, 2009). Theo đó, các cây chuyển gen *DREB3* được tăng cường khả năng chống chịu với stress hạn bằng cách tích lũy một lượng lớn proline tự do và duy trì lượng điện lực ở lá nhiều hơn cây không được chuyển gen.



Hình 5. Các giai đoạn phát triển của mảnh lá thuốc lá biến nạp



Hình 6. Kết quả gây hạn nhân tạo và tưới nước phục hồi các dòng thuốc lá chuyển gen.

KẾT LUẬN

Dựa vào trình tự *DREB3* (DQ055133.1), chúng tôi đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu và khuếch đại thành công đoạn gen *DREB3* từ RNA tổng số của cây đậu tương. Kết quả phân tích và so sánh cho thấy, trình tự gen *DREB3* thu được tương đồng 100% với gen *DREB3* đã được công bố trên ngân hàng GenBank. Dựa trên các phân tích trình tự amino acid vùng bảo thủ AP2, chúng tôi đã xác định được gen *DREB3* thuộc nhóm A₁ của họ gen *dreB*. Đồng thời, chúng tôi đã thiết lập thành công vector chuyển gen mang cấu trúc *rd29A::DREB3* và đánh giá sự hoạt động của cấu trúc này trong cây thuốc lá chuyển gen. Kết quả cho thấy, các dòng thuốc lá chuyển gen *rd29A::DREB3* có khả năng chịu hạn và phục hồi tốt hơn so với dòng không chuyển gen.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành trong chương trình đào tạo Thạc sĩ của học viên Bành Thị Mai Anh. Nghiên cứu được tiến hành có sự dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen và Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 25: 1263-1274.

Amudha J, Balasubramani G (2011) Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnol Mol Biol Rev* 6 (2): 31-58

Chen M, Xu Z, Xia L, Li L, Cheng X, Dong J, Wang Q, Ma Y (2009) Cold-induced modulation and functional

analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.) *J Exp Bot* 60 (1): 121-135.

Chomezynski P, Mackey K (1995) Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Short technical report. *Biotechniques* 19 (6): 942-5.

Enrico M, Kimmen S, Sarah H (2004) From Endonucleases to Transcription Factors: Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants. *Plant Cell* 16: 2265-2277.

Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998) *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi của cây lúa* Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Liu Q, Zhao N, Shinozaki K-Y (2000) Regulatory role of *DREB* transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance *Chin Sci Bull* 45 (11): 970-975.

Nguyễn Thị Thủy Hương (2011) "Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen *P5CS* liên quan đến tính chịu hạn và thử

thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam". *Luận án tiến sĩ sinh học*.

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and-cold-inducible gene expression *Biochem Biophys Res Commun* 290: 998-1009.

Nasreen S, Amudha J, Pandey SS (2013) Isolation and characterization of Soybean *DREB3* transcriptional activator. *J Appl Biol Biotechnol* 1 (02): 009-012.

Topping JF, In Foster GD, Taylor SC (1998) Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance. *Humana Press, Totowa* 81: 365-485.

Zhang M, Liu W, Bi YP (2009) Dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor in plants and its role during abiotic stresses. *Hereditas* 236-244.

Zhou ML, Ma JT (2010) Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *Afr J Biotechnol* 9: 9255-9279.

ISOLATION OF THE GENE ENCODING *DREB3* TRANSCRIPTION FACTOR FROM SOYBEAN AND EVALUATION OF THE ACTIVITY OF *rd29A::DREB3* CONSTRUCT IN TRANSGENIC TOBACO

Banh Thi Mai Anh^{1*}, Le Thu Ngọc², Phạm Bích Ngọc², Chu Hoang Ha²

¹College of Education, Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Unfavorable factors of environment are currently the major challenges for maintaining of sustainable development of food production for humans, in which drought and salt conditions are two of the most important factors inhibiting the development of agriculture production. In present, the research on plant stress focus on isolation and study of features of some genes related to the effects of unfavorable environment. Dehydration responsive element binding protein (DREB) is a transcription factor controlling transcription of the genes related to drought tolerance of plants. In this study, the *DREB3* gene was amplified from soybean cDNA using the specific primers designed based on the sequence of *DREB3* (No DQ055133.1). Nucleotide sequencing result showed that the sequence of the isolated *DREB3* gene is 100% similar to *DREB3* on GenBank. Based on the structure analysis of DREB3 protein, we have identified the conserved domain AP2 of the *DREB* gene family from the 138th to 197th amino acid. The result of phylogenetic tree construction based on the domain AP2 showed that the *DREB3* gene belongs to group A6 in the *DREB* subfamily. For the purpose of production of drought-resistant crops, the *DREB3* gene was inserted into transgenic vector pB1101::*rd29A* and was controlled by drought-inducible *rd29A* promoter. This construct was initially used to generate drought-resistant transgenic tobacco plants using *A. tumefaciens*. The result of drought treatment on 21 lines of transgenic tobacco showed more enhanced drought tolerance and better ability of recovery compared with control plants.

Keywords: *DREB3* gene, drought tolerance, *rd29A* promoter, soybean, tobacco

* Author for correspondence: E-mail: chuhuongha@ibt.ac.vn