

THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN DREB7 CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG

Nguyễn Thị Ngọc Lan¹, Nguyễn Thị Hải Yến², Đỗ Thanh Kim Hương¹,
Vi Thị Xuân Thủy³, Chu Hoàng Mậu^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm- ĐH Thái Nguyên,

²Trường Đại học Khoa học- ĐH Thái Nguyên, ³Trường Đại học Tây Bắc

TÓM TẮT

Đậu tương là loại cây trồng nhạy cảm với các stress phi sinh học và thuộc nhóm cây chống chịu kém, do vậy vấn đề đặt ra là ứng dụng công nghệ nào để tăng cường khả năng chống chịu các stress của cây đậu tương trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay. Protein dehydration-responsive element binding (DREB) là nhân tố phiên mã kích hoạt các gen liên quan đến tính chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương. Việc tăng cường biểu hiện gen DREB sẽ làm tăng hoạt động phiên mã của các gen chức năng và nâng cao khả năng chống chịu các stress của cây đậu tương. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen thực vật *pBI121_GmDREB7* để biến nạp vào cây đậu tương nhằm tạo dòng chuyển gen có khả năng chống chịu các stress của môi trường. Gen *GmDREB7* được tổng hợp nhân tạo có 609 bp, gồm vùng mã hóa, đoạn nucleotide chứa vị trí cắt của cặp enzyme giới hạn *XbaI/SacI*, trình tự mã hóa peptid kháng nguyên cmc. Hoạt động của vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7* được đánh giá trên cây thuốc lá thông qua phân tích PCR và RT-PCR.

Từ khóa: đậu tương; *GmDREB7*; họ nhân tố phiên mã AP2; stress phi sinh học; vector chuyển gen thực vật.

Ngày nhận bài: 12/6/2019; **Ngày hoàn thiện:** 15/7/2019; **Ngày đăng:** 16/7/2019

DESIGN OF PLANT TRANSGENIC VECTOR CARRYING THE GENE ENCODES DREB7 PROTEIN OF SOYBEAN PLANTS

Nguyen Thi Ngoc Lan¹, Nguyen Thi Hai Yen², Do Thanh Kim Huong¹,
Vi Thi Xuan Thuy³, Chu Hoang Mau^{1*}

¹University of Education - TNU,

²University of Science - TNU, ³Tay Bac University

ABSTRACT

Soybean is a crop sensitive to abiotic stresses and belongs to group of crops that are abiotic stress-resistant crops at a low level, therefore the issue raised is to apply which technology to increase the tolerance of soybean plants in the context of climate change today. Dehydration-responsive element binding (DREB) protein is a transcription factor that activates genes involved in abiotic stress tolerance of soybean plants. Overexpression of DREB genes will increase the transcriptional activity of functional genes and enhance resistance to the stresses of soybean plants. In this paper, we present the results of the plant transgenic vector design *pBI121_GmDREB7* for transformation into soybean in the aim of creation of transgenic soybean lines with resistance to environmental stresses. The *GmDREB7* gene was artificially synthesized with 609 bp in length, including the coding region, nucleotide fragment containing the cutting position of the limited enzyme pair *XbaI/SacI*, and the encoding sequence of the cmc antigen peptid. The activity of *pBI121_GmDREB7* transgenic vector was evaluated on tobacco plants through PCR and RT-PCR analyses.

Keywords: Soybean; *GmDREB7*; AP2 transcription factor family; abiotic stress; plant transgenic vector.

Received: 12/6/2019; **Revised:** 15/7/2019; **Published:** 16/7/2019

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

1. Giới thiệu

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là loại cây trồng có vị trí quan trọng trong các cây nông nghiệp và trong đời sống của con người. Đậu tương được xem là cây trồng khá nhạy cảm với các tác động của môi trường. Các stress phi sinh học như hạn, mặn, sốc nhiệt ... gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự sinh trưởng, phát triển của cây đậu tương và làm giảm năng suất, chất lượng hạt đậu tương. Vì vậy cải thiện khả năng chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương là vấn đề được quan tâm trong nghiên cứu ứng phó với biến đổi khí hậu hiện nay. Một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen liên quan đến tính chống chịu các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh của cây đậu tương đã được công bố. Lo và cs (2015) [1] đã báo cáo kết quả biểu hiện gen *GmEXPI* liên quan đến khả năng kéo dài rễ của cây đậu tương, Tan và cs (2015) [2] nghiên cứu biểu hiện mạnh gen mã hóa nhân tố phiên mã DREB2 đã làm tăng khả năng tích lũy prolin ở cây chuyển gen.

Họ AP2 là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã ở thực vật, bao gồm bốn phân họ lớn: AP2, RAV, ERF và DREB [3]. Phân họ protein dehydration-responsive element - binding (DREB) đặc trưng bởi miền bảo thủ AP2 chứa các vị trí liên kết với mạch DNA ở vùng promoter. Miền AP2 có khoảng 58 hoặc 59 amino acid, trong đó có một số amino acid liên kết với nhân tố đáp ứng sự mất nước (DRE) hoặc hộp GCC [2], [4]. Trình tự *cis* trong promoter của gen DREB và nhân tố *trans* của protein DREB đóng vai trò quan trọng trong biểu hiện gen đáp ứng với tác động của các stress phi sinh học. Nhân tố *trans* liên kết với các trình tự *cis* đã kích hoạt biểu hiện gen chức năng ở thực vật khi có tín hiệu stress từ môi trường. Đặc điểm của gen *DREB* ở cây đậu tương đã được tiếp cận nghiên cứu từ những năm đầu của thế kỉ XXI. Các gen *DREB1*, *DREB2*, *DREB5* đã được một số tác giả phân lập từ cây đậu tương [5], [6], [7], [8]. Liu và cs (2007) [9] đã phân lập được gen *GmDREB6* từ mRNA của cây đậu tương với kích thước là 693 bp. Một trình tự gen mã hóa protein chứa miền AP2 đã được

phân lập từ mRNA của cây đậu tương mang mã số BT092314 trên GenBank [10] là gen ứng cử viên được chúng tôi gán nhãn là *GmDREB7*. Gen *GmDREB7* có vị trí LOC100527471 trên nhiễm sắc thể số 12 của đậu tương. Vùng mã hóa của gen *GmDREB7* có kích thước 561 bp, có mã mở đầu là ATG và mã kết thúc là TGA, mã hóa 186 amino acid. Miền AP2 của protein *GmDREB7* có 59 amino acid chứa 11 amino acid liên kết với trình tự promoter ở các vị trí 66, 67, 69, 71, 73, 75, 79, 81, 88, 90, 93.

Một số thành viên của phân họ gen *DREB* được xác định có trong hệ gen của cây đậu tương như: *GmDREBa*, *GmDREBb*, *GmDREBc*, *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmDREB5*, *GmDREB6*, *GmDREB7* [11]. Nhóm gen *GmDREB1* đã được xác định là điều khiển tính chịu hạn, mặn và lạnh, nhóm gen *GmDREB2* lại có vai trò chủ yếu trong điều khiển tính chịu hạn [2], chịu nóng và sản phẩm của gen *GmDREB6* có chức năng kích hoạt gen *GmP5CS* phiên mã khi có tín hiệu stress mặn từ môi trường [12]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào báo cáo về chức năng của protein *GmDREB7* đối với quá trình phiên mã của các gen liên quan đến tính chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen *GmDREB7* phục vụ chuyển gen nhằm phân tích chức năng sinh học của gen *GmDREB7* trong cây đậu tương.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống thuốc lá K326 được sử dụng làm cây mô hình trong đánh giá hoạt động của vector chuyển gen thực vật. Vector chuyển gen pBI121 và chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 do 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

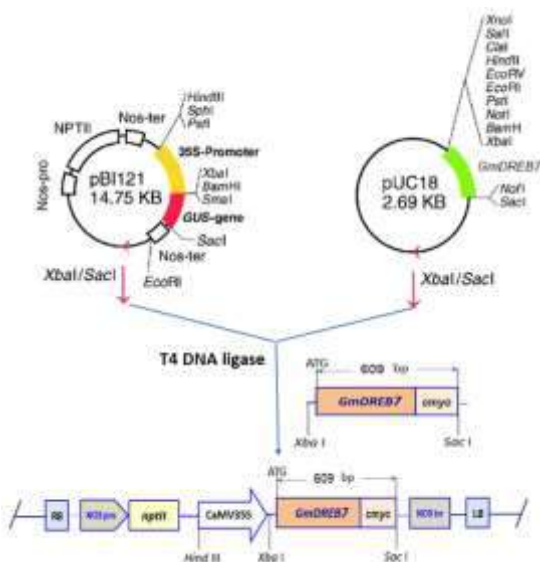
2.2.1. Phương pháp thiết kế gen *GmDREB7* và vector chuyển gen, tạo dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp

Vector chuyển gen *GmDREB7* được thiết kế theo hai bước cơ bản: Thiết kế cấu trúc độc lập mang gen chuyển *GmDREB7* và gắn cấu trúc gen *GmDREB7* vào vector chuyển gen thực vật pBI121.

Gen *GmDREB7* nhân tạo được thiết kế dựa trên trình tự gen *GmDREB7* (cDNA) mang mã số BT092314 trên GenBank [10]. Thêm 8 nucleotide (GCTCTAGA) ở đầu 5' chứa vị trí cắt của enzyme *XbaI* và 7 nucleotide (GAGCTCG) ở đầu 3' chứa vị trí cắt của enzyme *SacI*. Bổ sung 33 nucleotide mã hóa cho peptide kháng nguyên cmyc. Gen *GmDREB7* nhân tạo được gắn trong vector pUC18.

Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen thể hiện ở sơ đồ hình 1.

Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7* được biến nạp vào *A. tumefaciens* bằng xung điện (2,5 kV, 25 F, 200 Ω) để tạo ra vi khuẩn tái tổ hợp mang gen chuyển *GmDREB7*.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7*

2.2.2. Phương pháp tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

Chuyển gen vào cây thuốc lá tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) [13]. Sử dụng lá thuốc lá trong bình cây làm vật liệu

nhận gen. Các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1 cm² và cảm ứng trên môi trường tái sinh trong 48 giờ. Nuôi chọn lọc và phục hồi *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Các mảnh lá đã cảm ứng được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn 20 phút, thấm khô rồi chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy và đặt trong tối 2 ngày. Sau đó chuyển sang môi trường MS bổ sung BAP và kanamicin để tái sinh đa chồi. Các chồi được chuyển vào môi trường tạo rễ, bổ sung kanamicin. Các cây con được chuyển ra trồng trong chậu và nhà lưới.

2.2.3. Phương pháp phân tích cây thuốc lá chuyển gen

DNA tổng số tách chiết từ lá thuốc lá theo phương pháp của Saghai-Marooof và cs (1984) [14]. RNA tổng số được chiết rút bằng bộ kit Trizol (Invitrogen) và cDNA được tổng hợp từ RNA bằng bộ kit Maxima® First Strand (Fermantas). Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmDREB7* trong cây thuốc lá chuyển gen bằng PCR và phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmDREB7* ở mức phiên mã bằng RT-PCR. Cặp mồi *XbaI-DREB7-F/DREB7-SacI-R* sử dụng cho PCR có trình tự nucleotide là:

XbaI-DREB7-F: 5'-agaATGTTAGCGAAAACCCATAACA-3';
DREB7-SacI-R: 5'-ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGT-3'.

Kích thước đoạn DNA được nhân bản dự kiến là 609 bp.

3. Kết quả và thảo luận

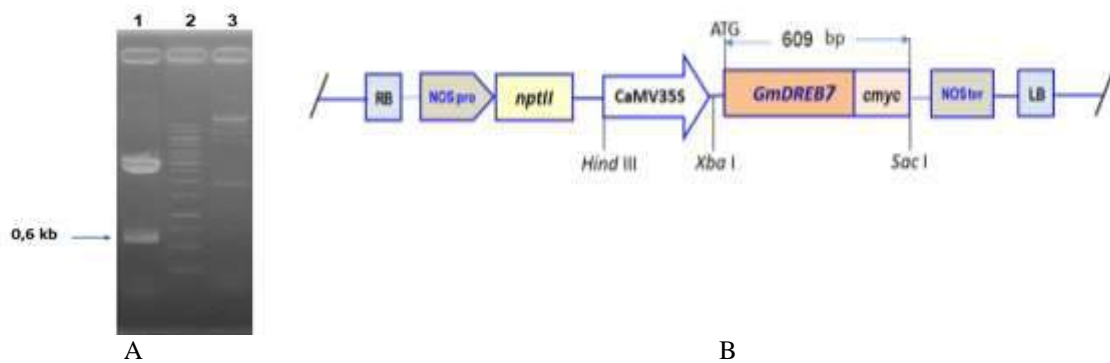
3.1. Thiết kế gen *GmDREB7* và vector chuyển gen thực vật mang gen *GmDREB7*

3.1.1. Thiết kế gen *GmDREB7* nhân tạo

Đoạn gen *GmDREB7* được thiết kế và tổng hợp nhân tạo dựa trên trình tự nucleotide của gen *GmDREB7* mang mã số BT092314 trên GenBank. Gen *GmDREB7* nhân tạo có 561 nucleotide, bổ sung 15 nucleotide chứa vị trí cắt của cặp enzyme *XbaI/SacI* và 33 nucleotide mã hóa peptid cmyc, tổng cộng là 609 nucleotide (Hình 2). Gen *GmDREB7* được gắn vào vector pUC18.

gctctagaATGTTAGCGAAAACCCATAACAAAGGGGATGGATCTAAGTCCCTGGCTAAGATACTGGCAAAA
 TGGAAAAGAATATAATGCCAGATTGATTCCAGCAGTGATGCGGATAAGCCAGTTCGCAAAGTTCCTGCCAA
 GGGATCGAAGAAGGGGTGCATGAAAGGTAAAGGGGGCCCTGAGAACTCGCGGTGTAAC TACAGAGGTGTTA
 GGCAAAGGACTTGGGGAAAGTGGGTGCTGAAATCCGAGAGCCAAACAGAGGCAATAGGCTTTGGCTAGGT
 ACTTTCCCCACTGCCATTGGAGCTGCCCTTGCATATGATGAAGCGGCCAGGGCAATGTACGGTTCCTGTGC
 CCGTCTCAACTTTCCCAATGTTTCAGTTTCCAGTTTCTCTGAAGAATCTTCCAAAGATTCCTCCGGTTGCGA
 ATCATTGTGGTTCGTCAATGGCAGTGTCTGCAAACGAGTCCATGATTTACCAAGTAAC TCGGGGGTAGGT
 GCAGAAGATGATGTTGATATGGAGCCCATTTCTTATCTTAAC TGTAAAGCATGAGAATGGGGGAAGGGA
 ACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTG**agactcg**

Hình 2. Trình tự đoạn gen *GmDREB7* nhân tạo có 609 nucleotide. Ở đầu 5' có *gctctaga* là trình tự chứa vị trí cắt của *XbaI* và ở đầu 3' có *gagctcg* chứa vị trí cắt của enzyme *SacI*



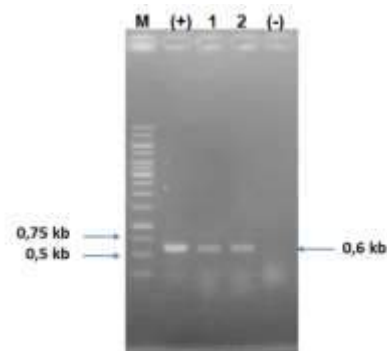
Hình 3. A: Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt gen *GmDREB7* trong vector *pUC18* và sản phẩm cắt vector *pBI121* bằng cặp enzyme giới hạn *SacI/XbaI*. Làn điện di số 1: Sản phẩm cắt vector *pUC18_GmDREB7*; Làn điện di số 2: Thang DNA 1 kb; Làn điện di số 3: Sản phẩm cắt vector *pBI121_GUS*. **B:** Sơ đồ cấu trúc vector *pBI121_GmDREB7* sử dụng cho chuyển gen vào thuốc lá nhờ *A. tumefaciens*. LB: Biên T-DNA trái; RB: Biên T-DNA phải; *nptII*: Neomycin-phospho-transferase II mã hóa kanamycin; CaMV35S: Promoter 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ; Gen *GmDREB7-cmvE* có 609 bp.

3.1.2. Tạo vector chuyển gen chứa gen *GmDREB7*

Tạo vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7* được thực hiện theo sơ đồ hình 1. Sử dụng cặp enzyme giới hạn *XbaI/SacI* để loại gen *GUS* từ vector *pBI121_GUS*; đồng thời cũng sử dụng cặp enzyme *XbaI/SacI* cắt để thu nhận gen *GmDREB7* (609 bp) từ vector *pUC18* (Hình 3A). Sử dụng enzyme nối T4 DNA ligase nối gen *GmDREB7* vào vector chuyển gen *pBI121* tạo thành vector tái tổ hợp *pBI121_GmDREB7* (Hình 3B).

Vector chuyển gen *pBI121_GmDREB7* được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng CV58. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *GmDREB7* trong hai dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng phản ứng colony-PCR thu được đoạn DNA có kích thước khoảng 0,6 kb tương ứng với kích thước của gen *GmDREB7*

(Hình 4). Như vậy, kết quả phân tích cho thấy, chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang gen *GmDREB7* có thể sử dụng trong biến nạp tạo cây thuốc lá chuyển gen.



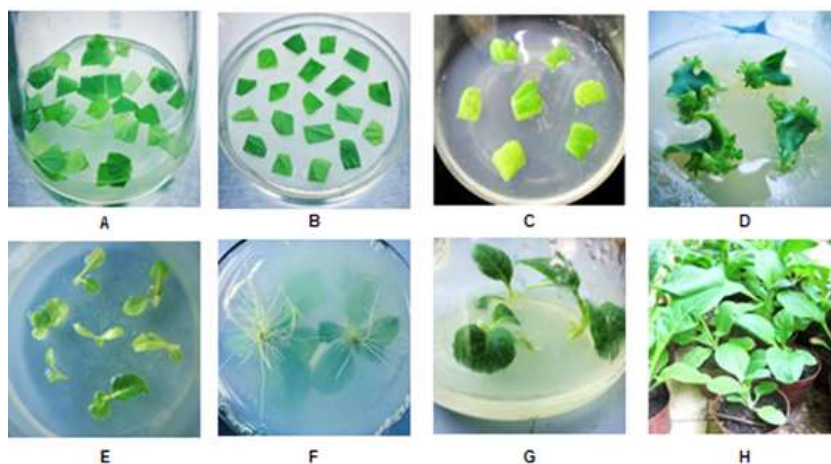
Hình 4. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR từ khuẩn lạc *A.tumefaciens* chủng CV58. M: thang DNA 1 kb; (+): vector *pBI121_GmDREB7*; 1, 2: Hai dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens* sau biến nạp; (-): chủng *A.tumefaciens* không biến nạp

3.2. Chuyển gen và phân tích cây thuốc lá chuyển gen

3.2.1. Kết quả chuyển cấu trúc mang gen *GmDREB7* vào thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*

Lây nhiễm *A. tumefaciens* chứa vector *pBI121_GmDREB7* vào mô lá thuốc lá, tái sinh chồi, ra rễ và tạo được cây thuốc lá chuyển gen *GmDREB7* (Hình 5). Kết quả biến nạp cấu trúc *pBI121_GmDREB7* vào thuốc lá thông qua *A.tumefaciens* ở bảng 1 cho thấy, sau 3 lần biến nạp và chọn lọc bằng kháng sinh, với 108 mảnh lá thuốc lá giống K326 thì có 96 mảnh lá tạo được cụm chồi.

Số chồi được tái sinh từ các cụm chồi là 265 chồi và số chồi sống sót và sinh trưởng tốt trong môi trường chọn lọc bằng kháng sinh được chuyển sang môi trường ra rễ là 202. Số cây sống sót *in vitro* được đưa ra bầu đất và chọn 45 cây sinh trưởng tốt để trồng tại nhà lưới. Ở lô ĐC0 với 30 mảnh lá không có mẫu nào sống sót được trong môi trường chọn lọc bằng kháng sinh; còn ở lô ĐC1, từ 30 mảnh lá có 92 chồi được tái sinh, số cây ra rễ sống sót *in vitro* là 86 được đưa ra bầu đất và lựa chọn 20 cây sinh trưởng tốt trồng tại nhà lưới làm đối chứng.



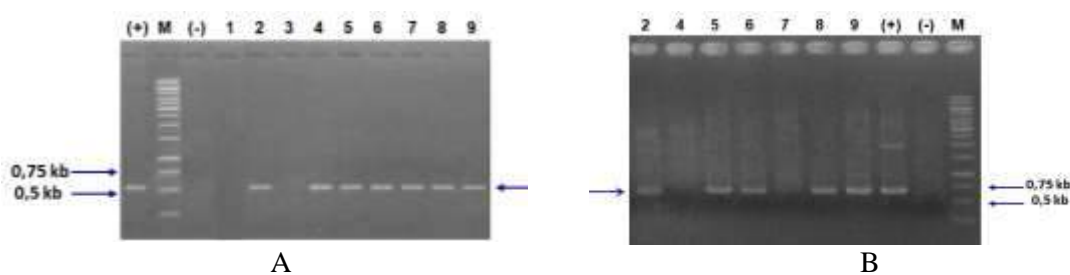
Hình 5. Hình ảnh mô tả quá trình chuyển gen *GmDREB7* và tái sinh tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*.

A: Mảnh lá ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn; B: Mảnh lá trên môi trường đồng nuôi cấy; C: Mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy trên môi trường chọn lọc; D: Tái sinh đa chồi; E: Các chồi trên môi trường ra rễ (RM); F,G: Cây thuốc lá trên môi trường ra rễ sau 2 tuần; H: Ra cây trong bầu đất ở điều kiện nhà lưới

Bảng 1. Kết quả biến nạp cấu trúc *pBI121_GmDREB7* vào thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng	Số mẫu lá	Số mẫu tạo cụm chồi	Số chồi được tái sinh	Số cây ra rễ	Số cây trồng trong nhà lưới	
ĐC0*	30	0	0	0	0	
ĐC1*	30	24	92	86	20	
Thí nghiệm	Lần 1	36	32	88	68	15
	Lần 2	36	34	95	74	15
	Lần 3	36	30	82	60	15
Tổng	108	96	265	202	45	

Ghi chú: ĐC0*: Mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1*: Mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh



Hình 6. A: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen *GmDREB7* trong các cây thuốc lá chuyển gen. M: Thang DNA 1 kb; (+): Đối chứng dương-sản phẩm nhân gen *GmDREB7* từ vector chuyển gen *pBII121_GmDREB7*; (-): Kết quả nhân gen *GmDREB7* từ cây không chuyển gen; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: Kết quả nhân gen *GmDREB7* từ các cây thuốc lá chuyển gen.

B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR trong các cây thuốc lá chuyển gen. M: Thang DNA 1 kb; (+): Đối chứng dương-sản phẩm nhân gen *GmDREB7* từ vector chuyển gen *pBII121_GmDREB7*; (-): Kết quả nhân gen *GmDREB7* từ cây không chuyển gen; 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9: Kết quả nhân cDNA *GmDREB7* từ 7 cây thuốc lá chuyển gen dương tính với PCR, tương ứng với T0-2; T0-4; T0-5; T0-6; T0-7; T0-8; T0-9.

3.2.2. Phân tích sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển *GmDREB7* trên cây thuốc lá chuyển gen

Thu lá non của 9 cây thuốc lá chuyển gen sinh trưởng bình thường ở thế hệ T0 trong nhà lưới, tách chiết DNA tổng số. Phân tích DNA tổng số bằng điện di trên gel 0,8% đã cho kết quả DNA tổng số thu được đảm bảo chất lượng để thực hiện PCR. Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmDREB7* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi *XbaI-DREB7F/ DREB7-SacI-R*, kết quả được thể hiện ở hình 6. Kết quả ở hình 6A cho thấy, trong 9 cây thuốc lá chuyển gen được phân tích thì có 7 cây cho kết quả dương tính với PCR, đó là các cây số 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 được ký hiệu là T0-2; T0-4; T0-5; T0-6; T0-7; T0-8; T0-9. Như vậy bước đầu có thể nhận xét rằng gen chuyển *GmDREB7* đã có mặt trong hệ gen của các cây thuốc lá chuyển gen. Tiến hành thu lá non từ 7 cây dương tính với PCR, T0-2; T0-4; T0-5; T0-6; T0-7; T0-8; T0-9 để tách chiết RNA tổng số, tạo cDNA và phân tích biểu hiện gen *GmDREB7* thông qua quá trình phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi *XbaI-DREB7-F/DREB7-R-SacI*. Kết quả cho thấy, trong 7 cây dương tính với PCR có 5 cây cho sản phẩm RT-PCR, đó là các cây T0-2; T0-5; T0-6; T0-8; T0-9 (Hình 6B). Như vậy, bước đầu đã xác định được gen chuyển

GmDREB7 đã được biểu hiện ở mức phiên mã tổng hợp mRNA trên cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0.

4. Kết luận

Gen *GmDREB7* được thiết kế có kích thước 609 bp gồm đoạn mã hóa (561 bp), các nucleotide chứa vị trí cắt của cặp enzyme giới hạn *XbaI/SacI* (15 nucleotide) và đoạn nucleotide mã hóa peptide kháng nguyên cmc (33 nucleotide). Vector chuyển gen thực vật *pBII121_GmDREB7* chứa gen *GmDREB7* đã được thiết kế thành công và tạo được dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang gen chuyển *GmDREB7*. Cấu trúc mang gen chuyển *GmDREB7* đã được biến nạp vào cây thuốc lá và tạo được các cây chuyển gen. Phân tích 9 cây thuốc lá chuyển gen đã xác định được 7 cây cho kết quả dương tính với PCR, trong đó gen chuyển *GmDREB7* được biểu hiện ở 5 cây thuốc lá chuyển gen. Như vậy, vector *pBII121_GmDREB7* bước đầu được đánh giá hoạt động tốt trên cây mô hình và có thể sử dụng để biến nạp vào cây đậu tương.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2018.27.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. S. Lo, H. D. Le, V. T. T. Nguyen, H. H. Chu, V. S. Le, H. M. Chu, "Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco", *Turk J. Bot.*, Vol. 39, pp. 988-995, 2015.
- [2]. D. X. Tan, H. M. Tuong, V. T. T. Thuy, L. V. Son, C. H. Mau, "Cloning and Overexpression of GmDREB2 Gene from a Vietnamese Drought-resistant Soybean Variety", *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Vol. 58, pp. 651-657, 2015.
- [3]. K. Shinozaki, Yamaguchi K. Shinozaki, "Molecular responses to drought and cold stress", *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 7, pp. 161-167, 1996.
- [4]. R. Mittler, "Abiotic stress, the field environment and stress combination", *Trends Plant Sci.*, Vol. 11, pp. 15-19, 2006.
- [5]. Y. Chen, P. Chen and B. G. de los Reyes, Analysis of the expression of DREB1 gene orthologs in cultivated and wild species of soybean, NCBI, Accession AY802779, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2004.
- [6]. D. V. Charlson, X. Hu, B. Okimoto, L. C. Purcell, "Glycine max cultivar Jackson drought responsive element binding protein 1 (DREB1)", *GenBank* FJ965342, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ965342>, 2009.
- [7]. M. Chen, Q. Y. Wang, X. G. Cheng, Z. S. Xu, L. C. Li, X. G. Ye, L. Q. Xia, Y. Z. Ma, "GmDREB2 a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, pp. 299-305, 2007.
- [8]. M. Chen, Y. Ma, Z. Xu, L. Li, Q. Wang, "Glycine max dehydration-responsive element binding protein 5 (DREB5) mRNA, complete cds.", *GenBank* EF583447, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF583447>, 2007.
- [9]. Y. W. Liu, M. Chen, Z. S. Xu, G. Y. Zh, L. C. Li, Y. Z. Ma, "Glycine max dehydration-responsive element binding protein 6 mRNA, complete cds.", *GenBank*: EF551166.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF551166>, 2007.
- [10]. F. Cheung, Y. Xiao, A. Chan, W. Moskal and C. D. Town, "Soybean clone JCVI-FLGm-10J23 unknown mRNA". *GenBank*: BT092314, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT092314>, 2009.
- [11]. J. L. Riechmann, J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Z. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Crelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman, G. L. Yu, "Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes", *Science*, Vol. 290, pp. 2105-2110, 2000.
- [12]. X. X. Zhang, Y. J. Tang, Q. B. Ma, C. Y. Yang, Y. H. Mu, H. C. Suo, L. H. Luo, H. Nian, "OsDREB2A, a Rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean", *PLoS ONE* 8:e83011. doi:83010.81371/journal.pone.0083011, 2013.
- [13]. J. F. Topping, "Tobacco transformation", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 81, pp. 365-372, <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:365>, 1998.
- [14]. M. A. Saghai-Marroof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R. W. Allard, "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, pp. 8014-8018;doi: [10.1073/pnas.81.24.8014](https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014), 1984.

