

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THU GIANG

**PHÂN TÍCH CHỨC NĂNG VÀ CƠ CHẾ ĐIỀU HÒA
CỦA CÁC NHÂN TỐ PHIÊN MÃ GmDREB5, GmDREB7
TRONG ĐÁP ỨNG VỚI STRESS MẶN Ở CÂY THUỐC LÁ
VÀ ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GENE**

Ngành: Di truyền học
Mã số: 9420121

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2026

Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM - ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân**
- 2. GS.TS. Chu Hoàng Mậu**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp đại học
hợp tại trường **ĐẠI HỌC SƯ PHẠM - ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

Vào hồigiờ... .ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm số - Đại học Thái Nguyên
- Thư viện Trường Đại học Sư phạm - ĐHTN

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyen, G. T., Nguyen, Y. T. H., Nguyen, H. D., Chu, M. H., & Nguyen, Q. H. (2025), “The DREB7 transcription factor enhances salt tolerance in soybean plants under salt stress”, Open life sciences, 20(1), 20251153. <https://doi.org/10.1515/biol-2025-1153> (SCI-E, Q2).
2. Nguyen, Y. T. H., Nguyen, G. T., Nguyen, H. D., Vu, T. T. T., Nguyen, L. T. N., Nguyen, Q. H., & Chu, M. H. (2025), “The *GmDREB5* from soybean enhanced salt tolerance by upregulating the transcription levels of *NtP5CS* and *NtSODFe* in transgenic tobacco”, Molecular biology reports, 52(1), 656. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10767-x> (SCI-E, Q2).
3. Nguyễn Thu Giang, Nguyễn Hữu Quân, Nguyễn Thị Hải Yên, Chu Hoàng Mậu (2025), “Sự tiến hóa của họ gene AP2 và phân họ gene DREB ở cây *Arabidopsis thaliana* và cây đậu tương”, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 230(09), tr.398-405. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12362> (ACI).
4. Nguyễn Thu Giang, Vu Trong Luong, Phạm Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Đức Hưng, Nguyễn Hữu Quân, Vi Thị Xuân Thủy, Nguyễn Thị Hải Yên, Chu Hoàng Mậu (2025), “Tạo cấu trúc biểu hiện gene *GmDREB5* liên quan đến chống chịu điều kiện bất lợi ở cây đậu tương [*Glycine max* (L.) Merr.]”, Kỷ yếu hội nghị sinh lý thực vật toàn quốc lần thứ 3 2025. Nxb Khoa học tự nhiên và Công nghệ, pp. 135-143.
5. Nguyễn Thu Giang, Nguyễn Thị Hải Yên, Vũ Thị Thu Thủy, Nguyễn Hữu Quân, Chu Hoàng Mậu (2026), “Đặc điểm của một số dòng đậu tương thể hệ TG1 mang gene *GmDREB7* được tăng cường biểu hiện”, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 231(01), tr.19-25. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.13248> (ACI).

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây trồng có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong cải tạo đất nhờ khả năng cố định đạm sinh học. Tuy nhiên, năng suất và chất lượng đậu tương thường bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi các yếu tố bất lợi của môi trường, đặc biệt là stress mặn và stress hạn. Dưới tác động của biến đổi khí hậu và quá trình canh tác kéo dài, tình trạng khô hạn và tích lũy muối trong đất ngày càng gia tăng, trở thành những thách thức lớn đối với sản xuất nông nghiệp nói chung và canh tác đậu tương nói riêng.

Khả năng chịu hạn và chịu mặn của thực vật là tính trạng phức tạp, được điều khiển bởi mạng lưới nhiều gene chức năng và gene điều hòa. Các gene chức năng tham gia trực tiếp vào quá trình đáp ứng stress thông qua điều hòa áp suất thẩm thấu, bảo vệ cấu trúc tế bào hoặc khử các dạng oxy hóa hoạt tính, như các gene liên quan đến sinh tổng hợp proline (*P5CS*, *P5CR*), phát triển bộ rễ (*Expansin*) hay các protein sốc nhiệt (HSP). Tuy nhiên, phần lớn các gene này chỉ tham gia vào từng cơ chế đáp ứng riêng lẻ. Trong khi đó, các gene mã hóa nhân tố phiên mã có khả năng điều hòa đồng thời nhiều gene mục tiêu, từ đó kiểm soát toàn bộ mạng lưới đáp ứng stress ở thực vật. Vì vậy, nhóm gene mã hóa nhân tố phiên mã được xem là đối tượng tiềm năng trong nghiên cứu cải thiện khả năng chống chịu stress phi sinh học ở cây trồng bằng công nghệ sinh học.

Trong số các họ nhân tố phiên mã ở thực vật, họ *AP2/ERF* (APETALA2/Ethylene Responsive Factor), đặc biệt là phân họ *DREB* (Dehydration Responsive Element Binding), được xác định giữ vai trò trung tâm trong cơ chế đáp ứng với stress hạn, mặn và nhiệt độ thấp. Các protein DREB chứa miền bảo tồn AP2 có khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với trình tự DRE/CRT (Dehydration Responsive Element/C-repeat) trong vùng promoter của gene mục tiêu, qua đó kích hoạt biểu hiện của nhiều gene liên quan đến chống chịu stress. Đặc điểm điều hòa đa gene này giúp các nhân tố phiên mã DREB trở thành mục tiêu quan trọng trong nghiên cứu nâng cao tính chống chịu của cây trồng trước điều kiện bất lợi của môi trường.

Ở đậu tương, nhiều gene thuộc phân họ *DREB* đã được xác định thông qua phân tích hệ gene và được dự đoán liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học. Tuy nhiên, chức năng sinh học cụ thể của phần lớn

các gene này vẫn chưa được làm sáng tỏ đầy đủ, đặc biệt là cơ chế điều hòa đáp ứng mặn và hạn ở cây chuyển gene. Một số gene như *GmDREB5* và *GmDREB7* đã được ghi nhận có tiềm năng tham gia điều hòa đáp ứng stress phi sinh học dựa trên đặc điểm trình tự và biểu hiện gene, nhưng các nghiên cứu chức năng trực tiếp còn hạn chế.

Xuất phát từ những cơ sở khoa học và thực tiễn trên, việc nghiên cứu chức năng của các gene mã hóa nhân tố phiên mã thuộc phân họ *DREB* ở đậu tương có ý nghĩa quan trọng trong việc làm sáng tỏ cơ chế phân tử liên quan đến khả năng chịu mặn và chịu hạn, đồng thời cung cấp cơ sở cho ứng dụng công nghệ chuyển gene trong chọn tạo giống cây trồng thích ứng với điều kiện bất lợi của môi trường. Vì vậy, luận án được thực hiện với đề tài: **“Phân tích chức năng và cơ chế điều hòa của các nhân tố phiên mã *GmDREB5*, *GmDREB7* trong đáp ứng với stress mặn ở cây thuốc lá và đậu tương chuyển gene”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được vai trò điều hòa của gene mã hoá protein *DREB5* và *DREB7* với một số gene mục tiêu trong điều kiện stress phi sinh học.

Tạo và đánh giá được một số dòng cây đậu tương chuyển gene *GmDREB7* có khả năng chống chịu stress mặn cao hơn đối chứng không chuyển gene.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu sự tiến hóa phân tử của họ gene *AP2* ở cây *Arabidopsis thaliana* và đậu tương

i) Sử dụng Tin sinh học để tìm kiếm và trích xuất các trình tự gene thuộc họ *AP2*, phân họ gene *DREB* của cây *A. thaliana* và cây đậu tương trên ngân hàng dữ liệu NCBI.

ii) Xác định số lượng gene họ *AP2*, phân họ gene *DREB*, vị trí, số bản copy của mỗi gene *DREB* trong hệ gene cây *A. thaliana* và cây đậu tương.

iii) Xây dựng cây phát sinh chủng loại của họ gene *AP2*, phân họ *DREB*, vùng *AP2* ở cây *A. thaliana* và cây đậu tương.

3.2. Nghiên cứu chức năng của gene mã hóa nhân tố phiên mã *DREB5* của cây đậu tương

i) Thiết kế gene và vector biểu hiện gene *GmDREB5* (*Glycine max* *DREB5*).

ii) Biến nạp cấu trúc mang gene *GmDREB5* vào thuốc lá và tạo dòng chuyển gene *GmDREB5*.

iii) Phân tích mối quan hệ giữa gene *GmDREB5* với mức độ phiên mã của một số gene mục tiêu ở cây thuốc lá.

iv) Phân tích sự tương tác giữa protein DREB5 và promoter của một số gene mục tiêu.

3.3. Nghiên cứu vai trò của gene mã hóa nhân tố phiên mã DREB7 ở cây đậu tương

i) Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene *GmDREB7* (*Glycine max* DREB7) vào đậu tương và tạo dòng đậu tương chuyển gene.

ii) Phân tích cây đậu tương chuyển gene bằng kỹ thuật Real time RT-PCR.

iii) Phân tích tương tác phân tử *in silico* protein DREB7 và promoter của gene *GmP5CS*.

iv) Đánh giá một số dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7* triển vọng về khả năng chịu hạn, chịu mặn.

4. Những đóng góp mới của luận án

4.1. Luận án đã xác định được vai trò điều hòa của gene *GmDREB5* ở đậu tương trong đáp ứng với stress mặn. *GmDREB5* có khả năng hoạt hóa biểu hiện các gene mục tiêu *NtP5CS* và *NtSODFe* ở cây thuốc lá, từ đó tăng cường cơ chế bảo vệ tế bào thông qua tổng hợp chất thẩm thấu và enzyme khử gốc tự do.

4.2. Vai trò điều hòa của gene *GmDREB7* trong điều kiện stress mặn đã được làm rõ. Sự biểu hiện mạnh của *GmDREB7* trong cây đậu tương chuyển gene đã làm tăng mức phiên mã của *GmP5CS*, tăng tích lũy proline và nâng cao khả năng thích ứng với stress mặn. Bốn dòng đậu tương chuyển gene (TG1-2, TG1-5, TG1-7, TG1-10) được chọn lọc thể hiện mức chịu hạn và chịu mặn vượt trội so với cây không chuyển gene (WT).

4.3. Luận án đã làm rõ cơ sở của sự tương tác phân tử giữa vùng AP2 của protein DREB và promoter của các gene (*NtP5CS*, *NtSODFe*, *GmP5CS*) thông qua phân tích docking phân tử *in silico*, từ đó củng cố bằng chứng về liên kết đặc hiệu giữa yếu tố phiên mã DREB và các yếu tố *cis* điều hòa đáp ứng stress.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Kết quả nghiên cứu đạt được của đề tài có giá trị khoa học và thực tiễn trong tiếp cận nghiên cứu cải thiện khả năng kháng hạn, mặn của cây đậu tương bằng kỹ thuật tăng cường biểu hiện gene.

Về mặt khoa học

Kết quả nghiên cứu đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế điều hòa đáp ứng stress mặn và hạn ở đậu tương thông qua vai trò của các yếu tố phiên mã thuộc phân họ DREB. Việc xác định chức năng điều hòa của gene *GmDREB5* và *GmDREB7* đã cung cấp bằng chứng thực nghiệm về mối liên hệ giữa hoạt động của các gene này với quá trình tổng hợp chất thẩm thấu và enzyme khử gốc tự do, qua đó làm rõ cơ sở phân tử của

khả năng chịu mặn ở cây đậu tương. Những kết quả này góp phần bổ sung hiểu biết về mạng lưới điều hòa gene liên quan đến cơ chế thích ứng sinh lý của thực vật trong điều kiện bất lợi.

Về mặt thực tiễn

Nghiên cứu đã xây dựng được cơ sở khoa học cho việc ứng dụng kỹ thuật chuyển gene trong chọn tạo giống đậu tương chịu mặn và chịu hạn, mở ra hướng tiếp cận tiềm năng trong cải thiện giống cây trồng thích ứng với biến đổi khí hậu.

Các kết quả công bố trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước là nguồn tư liệu có giá trị phục vụ cho nghiên cứu và giảng dạy trong lĩnh vực sinh học và công nghệ sinh học thực vật.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 162 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (4 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (40 trang); Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (12 trang); Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận (53 trang); Kết luận và đề nghị (2 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (15 trang); Phụ lục (20 trang). Luận án có 6 bảng, 23 hình, 13 phụ lục và 134 tài liệu tham khảo.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 03 tài liệu tiếng Việt và 131 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: 1) Đặc điểm họ nhân tố phiên mã AP2 và phân họ DREB; 2) Nghiên cứu chức năng của cây đậu tương trên cây mô hình; 3) Vai trò và ứng dụng của gene mã hóa nhân tố phiên mã trong cải thiện khả năng kháng hạn, mặn của cây đậu tương.

1.1. Đặc điểm họ nhân tố phiên mã AP2 và phân họ DREB

Nhân tố phiên mã đóng vai trò then chốt trong việc tổ chức và điều phối mạng lưới đáp ứng của thực vật trước các tác nhân stress phi sinh học. Thông qua khả năng nhận biết và liên kết đặc hiệu với các yếu tố *cis* nằm trong vùng điều hòa của gene đích, Các TF kiểm soát quá trình phiên mã, qua đó góp phần duy trì cân bằng thẩm thấu, bảo toàn tính toàn vẹn của cấu trúc tế bào và hạn chế tổn thương do sự tích lũy các dạng oxy hoạt tính. Trong số các họ TF đã được xác định ở thực vật, họ AP2 nổi bật nhờ quy mô lớn và tính đa dạng chức năng. Các protein thuộc họ này được đặc trưng bởi miền liên kết DNA AP2 có mức độ bảo tồn cao, kết hợp với các vùng chức năng đặc thù, cho phép chúng tương

tác linh hoạt với nhiều loại yếu tố *cis* và tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý khác nhau.

Trong phạm vi họ AP2, phân họ DREB được xem là nhóm có vai trò trực tiếp và hiệu quả trong điều hòa đáp ứng của thực vật đối với stress hạn và mặn, chủ yếu thông qua các con đường tín hiệu độc lập với ABA. Các nghiên cứu phát sinh chủng loại và phân tích chức năng trên nhiều loài thực vật đã chỉ ra rằng các gene *DREB*, đặc biệt thuộc các nhóm A-2 và A-5, có khả năng kích hoạt đồng thời nhiều gene bảo vệ tế bào liên quan đến điều chỉnh thẩm thấu, kiểm soát trạng thái oxy hóa khử và ổn định cấu trúc protein dưới điều kiện stress.

Ở đậu tương, số lượng lớn cùng với sự đa dạng cao của các gene thuộc họ AP2/ERF, phân họ *DREB*, phản ánh hệ quả của các sự kiện nhân đôi hệ gene trong tiến hóa cũng như khả năng thích nghi sinh thái linh hoạt của loài. Một số gene *DREB* như *GmDREB1*, *GmDREB2*, *GmDREB3* và *GmDREB6* đã được chứng minh có liên quan đến các cơ chế chịu hạn, chịu mặn và đáp ứng với nhiệt độ cao. Tuy nhiên, chức năng sinh học của nhiều gene *DREB* khác, trong đó *GmDREB5* và *GmDREB7* vẫn chưa có những nghiên cứu đầy đủ và sáng tỏ. Vì vậy, việc tập trung nghiên cứu hai gene này có ý nghĩa quan trọng không chỉ trong việc làm rõ các cơ chế điều hòa đáp ứng stress phi sinh học ở đậu tương, mà còn góp phần định hướng ứng dụng trong chọn tạo giống đậu tương chịu hạn, chịu mặn, đáp ứng yêu cầu sản xuất nông nghiệp bền vững trong bối cảnh biến đổi khí hậu..

1.2. Nghiên cứu chức năng gene của cây đậu tương trên cây mô hình

Các nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy việc sử dụng các hệ thống cây mô hình đóng vai trò quan trọng trong phân tích và xác định chức năng gene ở thực vật. Trong đó, cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) được xem là một hệ thống trung gian hiệu quả trong nghiên cứu chức năng gene của đậu tương nhờ hiệu suất chuyển gene cao, khả năng tái sinh mạnh và sinh khối lớn. Thông qua hệ thống này, nhiều gene của đậu tương đã được phân tích và chứng minh có vai trò quan trọng trong cơ chế đáp ứng với các điều kiện stress phi sinh học. Đặc biệt, các gene mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF, trong đó có phân họ DREB, được xác định là những thành phần điều hòa trung tâm trong mạng lưới đáp ứng stress thông qua việc kiểm soát biểu hiện của nhiều gene đích.

Các nghiên cứu trên cây thuốc lá chuyển gene mang các gene *DREB* của đậu tương như *GmDREB2* và *GmDREB6* cho thấy sự biểu

hiện của các gene này có thể làm tăng khả năng chịu hạn hoặc chịu mặn thông qua việc điều chỉnh mức tích lũy proline và kích hoạt biểu hiện của các gene đáp ứng stress như *NtP5CS* hoặc *NtCLC*. Bên cạnh đó, một số gene khác trong họ DREB cũng được ghi nhận có vai trò điều hòa theo các cơ chế khác nhau trong mạng lưới đáp ứng stress. Chẳng hạn, gene *GmDREB7* được chứng minh có thể tham gia điều hòa theo hướng âm đối với một số gene đáp ứng stress mặn ở cây thuốc lá chuyển gene, cho thấy sự đa dạng về chức năng và cơ chế điều hòa của các thành viên trong họ gene này.

Mặc dù vậy, hiểu biết hiện nay về chức năng của các gene thuộc họ DREB ở đậu tương vẫn còn hạn chế. Nhiều thành viên trong họ gene này chưa được phân tích đầy đủ về vai trò sinh học cũng như cơ chế điều hòa trong mạng lưới đáp ứng stress của thực vật. Đặc biệt, gene *GmDREB5*, một thành viên thuộc phân họ DREB của đậu tương, hiện vẫn chưa được nghiên cứu một cách hệ thống về chức năng sinh học cũng như khả năng tham gia điều hòa các gene đáp ứng stress ở thực vật. Do đó, việc tiếp tục nghiên cứu chức năng của *GmDREB5* thông qua hệ thống cây mô hình, đặc biệt là cây thuốc lá chuyển gene, là cần thiết.

1.3. Vai trò và ứng dụng của gene mã hóa nhân tố phiên mã trong cải thiện khả năng kháng hạn, mặn của cây đậu tương

Stress phi sinh học, đặc biệt là hạn hán và nhiễm mặn, là những yếu tố môi trường quan trọng gây suy giảm sinh trưởng và năng suất cây trồng. Làm giảm thể nước của tế bào, gây đóng khí khổng, ức chế quang hợp, phá vỡ cân bằng ion và thúc đẩy sự tích lũy các gốc tự do, như superoxide (O_2^-), hydroxyl ($\bullet OH$) và các chất không phải gốc tự do, như hydrogen peroxide (H_2O_2) có hoạt tính cao (ROS)

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy đậu tương có thể thích nghi với các điều kiện bất lợi thông qua các cơ chế sinh lý và sinh hóa khác nhau, bao gồm điều hòa thẩm thấu bằng sự tích lũy các chất hòa tan như proline, glycine betaine và đường tan; tăng cường hoạt động của hệ enzyme chống oxy hóa; cũng như điều chỉnh tín hiệu hormone và biểu hiện của các gene đáp ứng stress. Trong mạng lưới điều hòa này, các gene mã hóa nhân tố phiên mã, đặc biệt là các gene thuộc phân họ DREB của họ AP2/ERF, được xem là các yếu tố điều hòa quan trọng có khả năng kiểm soát đồng thời nhiều gene đích liên quan đến đáp ứng stress. Các nghiên cứu chuyển gene đã cho thấy việc biểu hiện quá mức một số gene DREB có thể góp phần cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn của cây thông qua việc điều hòa các quá trình sinh lý và sinh hóa liên quan.

Mặc dù vậy, chức năng sinh học của nhiều thành viên trong họ gene *DREB* ở đậu tương vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Bên cạnh các nghiên cứu thực nghiệm, các phương pháp tin sinh học, đặc biệt là phân tích tương tác phân tử giữa miền AP2 của protein DREB và các vùng promoter của gene đích, đang được ứng dụng nhằm dự đoán cơ chế điều hòa và định hướng lựa chọn các gene có tiềm năng chức năng. Do đó, việc tiếp tục nghiên cứu chức năng của các gene *DREB* ở đậu tương là cần thiết nhằm làm sáng tỏ cơ chế điều hòa đáp ứng stress và cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các giống đậu tương có khả năng chịu hạn và chịu mặn tốt hơn.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Các vật liệu thực vật: Giống thuốc lá K326 (*N. tabacum*) nuôi cấy *in vitro* được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. ĐT26 là giống đậu tương được trồng phổ biến tại Việt Nam được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu và phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Các chủng vi khuẩn và vector sử dụng trong nghiên cứu: Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* dùng cho mục đích nhân dòng vector và chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 mang các cấu trúc biểu hiện *pBI121_GmDREB7* được cung cấp bởi đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo (mã số B2023-TNA-26) và được lưu giữ và cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Các vector sử dụng trong nghiên cứu bao gồm vector tách dòng pTWIST (Twist Bioscience, Hoa Kỳ), vector biểu hiện gene pFGC5941 (NovoPro Bioscience, Hoa Kỳ) và pBI121 (Bioactiva Diagnostica, Đức) mang promoter CaMV35S.

2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ

Hóa chất: Các loại kit, Các enzyme cắt giới hạn và enzyme nối. Các hóa chất như Peptone, cao nấm men, agarose, sucrose, glucose, tryptone, X-gal, KCl, Tris-HCl, EDTA, NaOH, MgSO₄, MgCl₂, glycerol, CaCl₂; cùng với các kháng sinh chọn lọc như kanamycin, rifamycin, cefotaxime, carbenicillin được cung cấp bởi các hãng uy tín.

Thiết bị: máy PCR System 9700, hệ thống điện di, máy soi gel, máy vortex, máy ly tâm, máy xung điện, máy đo hàm lượng acid nucleic, cùng các thiết bị hỗ trợ hiện đại khác phục vụ cho nghiên cứu sinh học phân tử và nuôi cấy mô thực vật.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

L luận án đã sử dụng các nhóm phương pháp nghiên cứu, bao gồm: 1) Nhóm phương pháp tin sinh học; 2) Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gene và biểu hiện trong cây thuốc lá và đậu tương; 3) Nhóm phương pháp phân tích biểu hiện gene và phương pháp docking phân tử; 4) Phương pháp phân tích và xử lý số liệu.

2.3.1. Nhóm phương pháp tin sinh học

Gồm các phương pháp: Thu thập dữ liệu về các gene thuộc họ AP2 và phân họ DREB; Phân tích đặc điểm và tiến hóa phân tử của các gene họ AP2 và phân họ DREB; Phân tích tiến hóa vùng AP2 trong protein DREB.

2.3.2. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gene và biểu hiện trong cây thuốc lá và đậu tương

Gồm: Thiết kế gene, vector chuyển gene và tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp; Chuyển gene gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*

2.2.3. Nhóm phương pháp phân tích biểu hiện gene

Gồm: Phương pháp xử lý dòng chuyển gene bằng stress muối; Phương pháp xác định sự có mặt của gene chuyển; Phân tích sự biểu hiện của gene chuyển; Phân tích hàm lượng proline; Đánh giá chức năng sinh học của gene chuyển và phương pháp docking phân tử

2.3.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các phần mềm Tin sinh học được sử dụng trong phân tích hệ gene như MEGA11, BioEdit, BLAST trong NCBI.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Phân tích phương sai (ANOVA) và phép kiểm định Tukey được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm. Mức ý nghĩa thống kê được xác định tại các ngưỡng $p < 0,05$; $p < 0,01$ và $p < 0,001$ tùy theo từng chỉ tiêu phân tích.

2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN

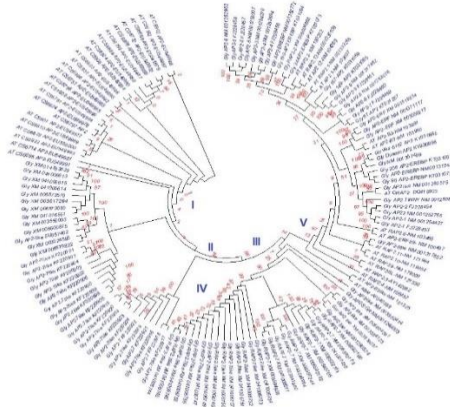
L luận án được hoàn thành tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. TIẾN HÓA PHÂN TỬ CỦA HỌ GENE AP2 Ở CÂY *A. thaliana* VÀ ĐẬU TƯƠNG

3.1.1. Sự tiến hóa của họ gene AP2 ở cây *A. thaliana* và đậu tương

Dựa trên kết quả phân tích BLAST đối với cơ sở dữ liệu NCBI, tổng cộng 143 trình tự gene thuộc họ AP2 đã được xác định và thu thập.



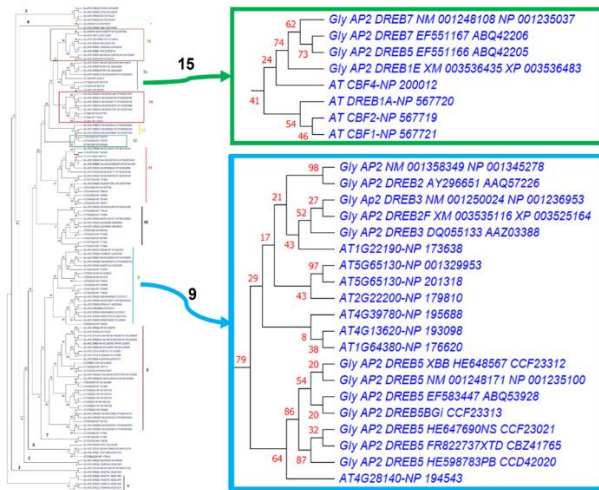
Hình 3.1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa phân tử của các thành viên của họ gene AP2 ở *A. thaliana* và đậu tương theo phương pháp ML và JTT maxtrix-based model trong MEGA.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) sử dụng mô hình thay thế amino acid JTT trong phần mềm MEGA cho thấy các trình tự AP2 của *A. thaliana* và đậu tương được phân chia thành năm nhóm chính, ký hiệu từ nhóm I đến nhóm V (Hình 3.1). Kết quả phân tích cho thấy nhóm I bao gồm 24 trình tự AP2 đặc trưng của *A. thaliana*, phản ánh một nhánh tiến hóa riêng biệt gắn liền với lịch sử tiến hóa của loài này. Ngược lại, các nhóm II, III và IV lần lượt chứa 34; 11 và 31 trình tự AP2 của đậu tương, tạo thành các nhóm đơn ngành đặc trưng cho đậu tương. Đáng chú ý, nhóm V được xác định là nhóm cận đơn ngành, bao gồm tổng cộng 53 trình tự AP2, trong đó có 18 trình tự của *A. thaliana* và 35 trình tự của đậu tương. Sự hiện diện đồng thời các trình tự từ cả hai loài trong cùng một nhóm phát sinh chủng loại cho thấy mức độ bảo tồn cao về cấu trúc và chức năng của một số gene AP2 trong suốt quá trình tiến hóa phân ly giữa hai loài.

3.1.2. Tiến hóa của phân họ gene *DREB* ở *A. thaliana* và ở đậu tương

Trong nghiên cứu này, 50 trình tự protein DREB của *A. thaliana* được sử dụng làm trình tự truy vấn để tìm kiếm các gene tương đồng trong hệ gene đậu tương. Kết quả phân tích đã xác định được 78 trình tự protein, tương ứng với 18 gene *DREB* khác nhau trong hệ gene đậu tương. Ở *A. thaliana*, các gene *DREB* được phân bố trên toàn bộ 5 nhiễm sắc thể, với tổng cộng 12 gene *DREB*. Trong đó, nhiễm sắc thể số 1 chứa số lượng trình tự DREB nhiều nhất (15 trình tự) trong khi nhiễm sắc thể số 3 chỉ mang 5 trình tự (nhiễm sắc thể có số lượng thấp nhất).

3.1.3. Đặc điểm miền AP2 trong protein DREB của đậu tương và cây *A. thaliana*



Hình 3.3. Sơ đồ phát sinh chủng loại miền AP2 của phân họ protein DREB5 và DREB7 ở đậu tương và cây *A. thaliana* theo phương pháp Maximum likelihood. (Gly: *Glycine max* = Gm; AT: *A. thaliana*)

Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự amino acid của miền AP2 trong các protein DREB ở đậu tương và *A. thaliana* được thực hiện bằng phần mềm MEGA11. Kết quả cho thấy cây tiến hóa được xây dựng từ 128 trình tự amino acid của miền AP2 được phân chia thành 16 nhóm riêng biệt (Hình 3.3). Trong đó, 9 nhóm được xác định là các nhóm đơn ngành (nhóm 1; 2; 3; 4; 5; 7; 12; 13 và 16) và 7 nhóm là các nhóm cận đơn ngành (nhóm 6; 8; 9; 10; 11; 14 và 15). Các nhóm đơn ngành thường chứa số lượng trình tự tương đối thấp, dao động từ 2 đến 8 trình tự, trong khi các nhóm cận đơn ngành bao gồm số lượng trình tự

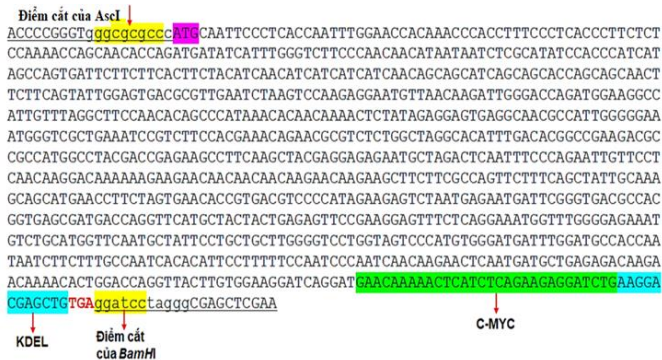
lớn hơn, từ 4 đến 28 trình tự. Kiểu phân bố này phản ánh sự bảo tồn xen kẽ với đa dạng hóa của miền AP2 trong phân họ DREB, đồng thời gợi ý vai trò của quá trình nhân đôi gene và phân hóa chức năng trong lịch sử tiến hóa của họ gene này.

Như vậy, so với các công bố trước, nghiên cứu không chỉ củng cố vai trò trung tâm của WGD trong sự mở rộng của họ gene AP2 ở đậu tương, mà còn làm rõ mô hình bảo tồn và phân hóa tiến hóa của họ gene này ở nhiều cấp độ, từ họ AP2, phân họ DREB đến miền chức năng AP2. Những kết quả trên góp phần mở rộng hiểu biết về quá trình tiến hóa phân tử của các nhân tố phiên mã AP2, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc lựa chọn và khai thác các gene ứng viên để làm rõ chức năng và định hướng ứng dụng cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn ở cây trồng.

3.2. NGHIÊN CỨU CHỨC NĂNG CỦA GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB5 CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG

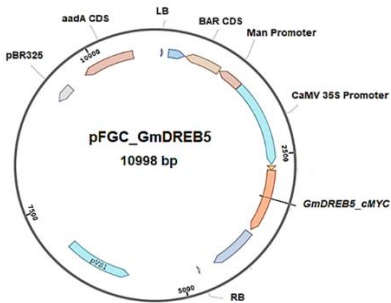
3.2.1. Thiết kế gene và vector biểu hiện *GmDREB5*

Sau khi hoàn tất quá trình thiết kế, gene *GmDREB5* được tổng hợp nhân tạo là 1.006 nucleotide (Hình 3.4) và gắn vào vector nhân dòng pTwist, tạo thành vector tái tổ hợp *pTWIST_GmDREB5-syn*. Vector tái tổ hợp này sau đó được biến nạp vào vi khuẩn E. coli nhằm phục vụ cho quá trình nhân dòng và lưu giữ gene mục tiêu. Các dòng khuẩn lạc dương tính mang plasmid chứa gene *GmDREB5-syn* được sàng lọc và tuyển chọn theo các tiêu chí phù hợp. Tiếp theo, plasmid *pTWIST_GmDREB5-syn* từ các dòng vi khuẩn được lựa chọn nhân bản, tách chiết và tinh sạch.

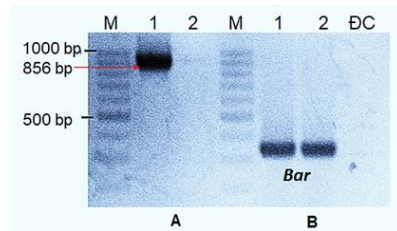


Hình 3.4. Trình tự nucleotide của gene *GmDREB5* chứa điểm cắt của enzyme AscI và BamHI; trình tự mã hoá cmc và KDEL.

Đoạn gene *GmDREB5* sau khi được tinh sạch gắn vào vector biểu hiện pFGC5941 thông qua phản ứng ghép nối xúc tác bởi enzyme T4 DNA ligase, tạo thành vector tái tổ hợp *pFGC_GmDREB5* (Hình 3.6). Để xác định các dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pFGC_GmDREB5*, phản ứng colony-PCR được tiến hành với hai cặp môi đặc hiệu cho gene *GmDREB5* và gene *Bar*. Kết quả điện di cho thấy ở Hình 3.7A, làn điện di số 1 xuất hiện băng DNA có kích thước nằm trong khoảng 856 bp, phù hợp với kích thước dự kiến của gene *GmDREB5*, trong khi làn điện di số 2 không xuất hiện băng khuếch đại, chứng tỏ không mang gene mục tiêu.



Hình 3.6. Cấu trúc của vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5*. aadA CDS: Mã hóa aminoglycoside phosphotransferase; LB: Lắp lại viền trái từ C58 T-DNA; BAR CDS: Mã hóa phosphinothricin acetyltransferase; Man Promoter: Promoter mannopine synthase; CaMV 35S Promoter: Promoter virus khảm súp lơ; GmDREB5_cMYC: Vùng gene *GmDREB5* chứa cMYC; RB: Lắp lại viền phải từ C58 T-DNA.



Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra khuẩn lạc. A: Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp môi *GmDREB5*-F/MYC-KDEL-R; B: Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp môi *BarR3*-F/*BarR1*-R.

M: thang DNA chuẩn; Làn 1: khuẩn lạc *A. tumefaciens* tái tổ hợp đã chọn lọc; Làn 2: plasmid pFGC5941; DC: Đối chứng âm mẫu trống.

3.2.2. Biến nạp cấu trúc biểu hiện gene *GmDREB5* và sàng lọc các dòng thuốc lá mang *GmDREB5*

Kết quả chi tiết của từng đợt biến nạp được trình bày trong Bảng 3.2. Trong ba lần thí nghiệm, tổng cộng 90 mẫu mô lá thuốc lá được sử dụng để biến nạp với cấu trúc mang gene *GmDREB5*. Sau giai đoạn đồng nuôi cấy và tái sinh hình thành chồi, 70 mẫu mô vẫn duy trì khả năng sống, 162 cụm chồi đã được hình thành, 35 chồi tiếp tục ra rễ trên môi trường chọn lọc và tổng cộng 23 cây con hoàn chỉnh đã được thu nhận và chuyển sang trồng trong giá thể tại nhà lưới nhằm theo dõi sinh trưởng và phục vụ cho các phân tích sinh học phân tử tiếp theo.

Bảng 3.2. Kết quả biến nạp cấu trúc *pFGC_GmDREB5* vào thuốc lá

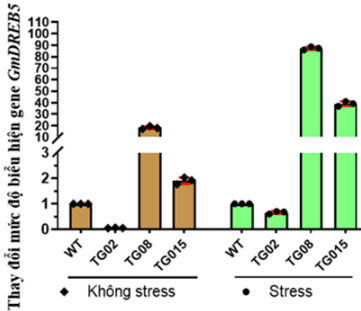
Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu biến nạp	Số mẫu sống sót	Số cụm chồi được tạo thành	Số chồi sống sót qua chọn lọc	Số chồi ra rễ qua chọn lọc	Số cây đem trồng trong giá thể trong nhà lưới
Thí nghiệm	Lần 1	30	25	62	26	12	7
	Lần 2	30	22	42	15	8	6
	Lần 3	30	23	58	11	15	10
Tổng		90	70	162	52	35	23
ĐC1		30	0	0	0	0	0
ĐC0		30	22	45	88	35	12

Trong số cây thuốc lá được biến nạp, 18 cây chuyển gene TG0 trong ống nghiệm đã được chọn để thiết lập các dòng chuyển gene. ba dòng chuyển gene (TG02, TG08 và TG015) cùng với cây WT biểu hiện sự sinh trưởng bình thường đã được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Các kết quả từ phân tích RT-PCR và Western blot cho thấy gene *GmDREB5* được phân lập từ đậu tương không chỉ được tích hợp ổn định vào hệ gene cây thuốc lá K326 mà còn được phiên mã và dịch mã hiệu quả thành protein tái tổ hợp ở thể hệ TG0. Những kết quả này cung cấp bằng chứng tin cậy cho việc biểu hiện chức năng của *GmDREB5* trong hệ thống cây mô hình, đồng thời tạo nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm làm rõ vai trò sinh học của gene này trong việc cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn ở các cây chuyển gene.

3.2.3. Phân tích mối quan hệ giữa gene *GmDREB5* và mức độ phiên mã của một số gene mục tiêu ở cây thuốc lá

3.2.3.1. Ảnh hưởng của sự biểu hiện *GmDREB5* đến mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* và *NtSODFe* ở cây thuốc lá chuyển gene



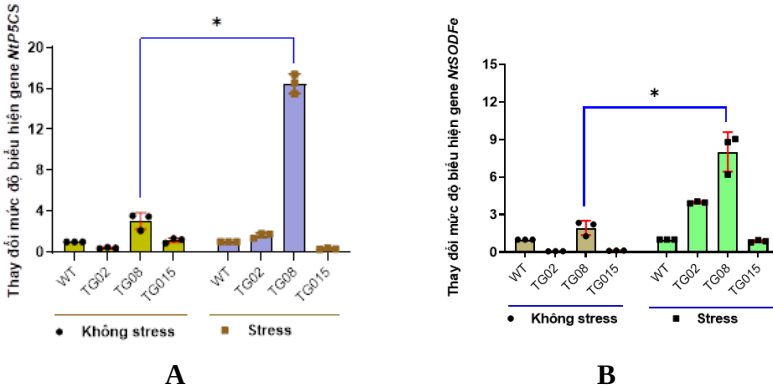
Hình 3.10. Sự thay đổi mức độ phiên mã của gene *GmDREB5* giữa các dòng thuốc lá chuyển gene và cây WT trong điều kiện không bị stress và stress mặn.

Biểu đồ Hình 3.10 cho thấy trong cả điều kiện tưới nước bình thường và điều kiện stress do muối, mức độ phiên mã ở các dòng TG08 và TG015 cao hơn so với dòng TG02 và cây WT ($p < 0,05$) (Hình 3.10A). Với mức tăng lần lượt là 87,31 lần (TG08) và 39,07 lần (TG015). Kết quả này cho thấy *GmDREB5* được biểu hiện ổn định trong hệ gene cây thuốc lá chuyển gene và chịu sự cảm ứng mạnh dưới điều kiện stress mặn,

Mối quan hệ giữa gene chuyển *GmDREB5* và mức độ biểu hiện của các gene *NtP5CS* và *NtSODFe* trong các dòng thuốc lá chuyển gene và cây WT được phân tích ở hai điều kiện, tưới nước thường xuyên và stress mặn và được thể hiện ở biểu đồ A và B của Hình 3.11.

Trong Hình 3.11A, gene *NtP5CS* ở dòng chuyển gene TG08 có mức độ phiên mã cao hơn đáng kể so với cây WT, với mức tăng gấp 3,05 lần (không stress) và gấp 16,47 lần (stress mặn). Dưới stress mặn, mức độ biểu hiện của *NtP5CS* trong TG08 cao hơn 5,41 lần so với điều kiện không stress.

Trong Hình 3.11B, gene *NtSODFe* trong cả hai dòng TG02 và TG08 đều thể hiện mức độ phiên mã cao hơn đáng kể ở điều kiện stress mặn so với không stress, với mức tăng gấp 4,12 lần (TG08) và gấp 51,60 lần (TG02).

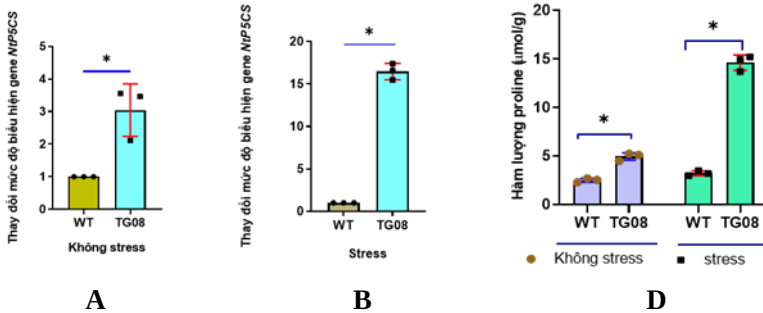


Hình 3.11. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của gene *NtP5CS* (A) và *NtSODFe* (B) trong các dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* dưới điều kiện không bị stress và stress mặn.

Các kết quả này cho thấy sự biểu hiện tăng cường của gene *GmDREB5* có mối liên hệ chặt chẽ với sự cảm ứng phiên mã của các gene tham gia vào cơ chế điều hòa thẩm thấu thông qua sinh tổng hợp proline (*NtP5CS*) và hệ thống chống oxy hóa (*NtSODFe*) khi cây chịu stress mặn. Qua đó, *GmDREB5* có thể đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt các con đường bảo vệ tế bào, góp phần nâng cao khả năng thích nghi của cây thuốc lá chuyển gene trong điều kiện môi trường bất lợi.

3.2.3.2. Mối quan hệ giữa mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* và hàm lượng proline ở các dòng thuốc lá chuyển gene

Hình 3.12 cho thấy mối liên hệ giữa mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* và hàm lượng proline ở dòng thuốc lá chuyển gene TG08 so với cây WT trong điều kiện sinh trưởng bình thường và khi chịu stress mặn. Khi cây được xử lý bằng muối, sự sai khác này tăng lên rõ rệt, với mức biểu hiện của *NtP5CS* ở dòng TG08 cao hơn 16,47 lần so với WT (Hình 3.12B). Song song với sự gia tăng ở mức độ phiên mã của *NtP5CS*, hàm lượng proline trong dòng TG08 cũng ghi nhận xu hướng tăng tương ứng. Cụ thể, trong điều kiện không stress, hàm lượng proline ở dòng TG08 cao hơn 1,96 lần so với cây WT; khi chịu stress mặn, giá trị này tăng lên 4,50 lần (Hình 3.12D).

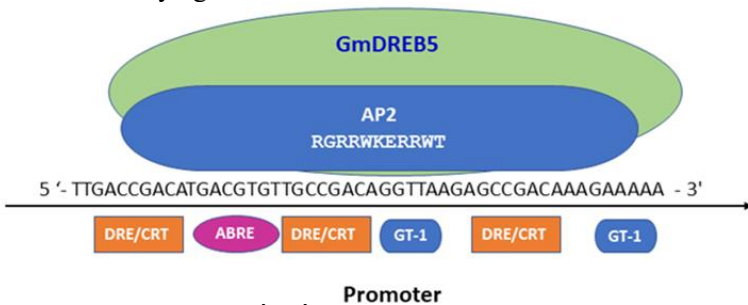


Hình 3.12. Sự thay đổi mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* và hàm lượng proline giữa dòng thuốc lá chuyển gene TG08 và cây WT trong điều kiện không bị stress và stress mặn.

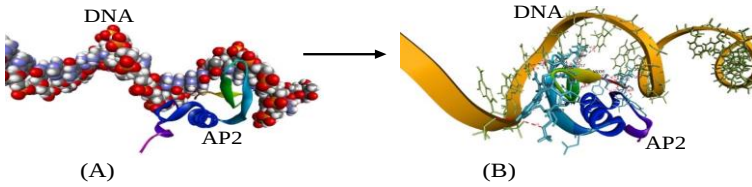
(A, B) Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* giữa dòng chuyển gene TG08 với cây WT trong hai điều kiện không xử lý stress và xử lý stress mặn ($p < 0,05$). (D) Biểu đồ so sánh hàm lượng proline giữa dòng chuyển gene TG08 và cây WT, giữa điều kiện không xử lý và xử lý stress mặn.

3.2.4. Docking phân tử giữa miền AP2 của protein DREB5 và vùng promoter của một số gene mục tiêu

Các phân tích docking phân tử đã cung cấp thêm bằng chứng hỗ trợ cho cơ chế điều hòa ở mức phân tử. Miền AP2 của *GmDREB5* được dự đoán có khả năng tương tác trực tiếp với các yếu tố *cis* quan trọng trong vùng promoter của *NtP5CS* và *NtSODFe*, bao gồm các motif GT-1 và DRE/CRT. Các amino acid bảo tồn trong miền AP2 tham gia hình thành các liên kết hydro ổn định với DNA, cho thấy khả năng gắn kết đặc hiệu và có ý nghĩa sinh học.



Hình 3.13. Mô hình thiết kế docking phân tử giữa vùng AP2 của protein *GmDREB5* và các motif tác động *cis* của promoter gene *NtP5CS* và *NtSODFe*.

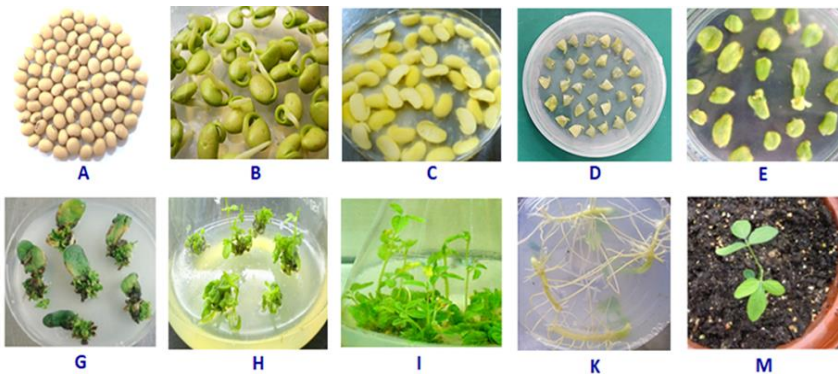


Phân tích đặc tính liên kết cũng cho thấy phức hợp giữa AP2 và promoter *NtP5CS* có ái lực cao hơn so với phức hợp với promoter *NtSODFe*, phù hợp với dữ liệu thực nghiệm về mức độ cảm ứng mạnh hơn của *NtP5CS* ở các dòng chuyển gene.

3.3. VAI TRÒ CỦA GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB7 Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

3.3.1. Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene *GmDREB7* vào cây đậu tương và tạo cây đậu tương chuyển gene

Cấu trúc gene được thiết kế bao gồm vùng mã hóa dài 624 bp, trình tự mã hóa kháng nguyên c-MYC (33 bp), đoạn tín hiệu KDEL (12 bp) và các vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn bao gồm XbaI, BamHI, XmaI và SacI (Phụ Lục 13). Sau khi hoàn thiện, cấu trúc mang gene *GmDREB7* được chuyển vào cây đậu tương thông qua phương pháp biến nạp gián tiếp sử dụng dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp, với vật liệu là nách lá mầm, nhằm tạo ra các dòng đậu tương chuyển gene phục vụ cho các phân tích chức năng tiếp theo.



Hình 3.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh *in vitro* và tạo cây đậu tương chuyển gene.

Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR cho thấy 9/10 cây TG0 (bao gồm các dòng TG0-1, TG0-2, TG0-3, TG0-4, TG0-5, TG0-6, TG0-7, TG0-9 và TG0-10) xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 0,65 kb, phù hợp với kích thước dự kiến của đoạn gene *GmDREB7* được khuếch đại. Ngược lại, không ghi nhận băng DNA ở cây TG0-8 cũng như ở cây đối chứng (WT). Kết quả này chứng minh rằng cấu trúc mang gene *GmDREB7* đã được tích hợp thành công vào hệ gene của các cây đậu tương chuyển gene và được phiên mã ổn định ở 9 dòng TG0.

Theo dõi quá trình sinh trưởng và phát triển của chín cây TG0 có kết quả RT-PCR dương tính gene *GmDREB7* cho thấy bảy cây đã ra hoa và hình thành quả. Trong số các cây này, bốn cây (TG0-2, TG0-5, TG0-7 và TG0-10) có khả năng tạo hạt. Hạt thu được từ bốn cây TG0 đã được nảy mầm và trồng trong điều kiện nhà lưới, qua đó tạo ra bốn dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 là TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10.

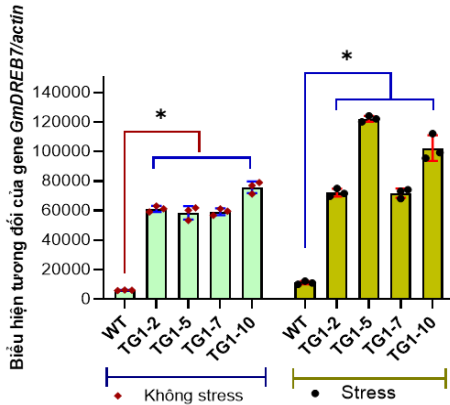
3.3.2. Phân tích các dòng đậu tương chuyển gene

3.3.2.1. Đánh giá các dòng chuyển gene thế hệ TG1 dưới điều kiện stress mặn

Thí nghiệm xử lý stress mặn được tiến hành trên các dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 và cây đối chứng (WT) bằng dung dịch NaCl với nồng độ tăng dần từ 150 mM đến 250 mM. Với nồng độ 150 mM NaCl chưa gây ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng và phát triển ban đầu của cả cây đối chứng và các dòng đậu tương chuyển gene. Ở thời điểm sau lần xử lý thứ ba với nồng độ NaCl 250mM, cây WT và dòng đậu tương TG1-7 biểu hiện dấu hiệu mất nước rõ rệt nhất, thể hiện qua hiện tượng héo lá và suy giảm sức trương tế bào, cho thấy các dòng chuyển gene còn lại chịu căng thẳng mặn ở mức độ cao hơn so với cây WT và dòng TG1-7.

3.3.2.2. Phân tích mức độ phiên mã của *GmDREB7* ở dòng đậu tương chuyển gene và cây WT sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl

Bằng phương pháp qRT-PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu qRT-DREB7-F/qRT-DREB7-R tiến hành phân tích mức độ phiên mã của gene *GmDREB7* kết quả được trình bày trong Hình 3.19.

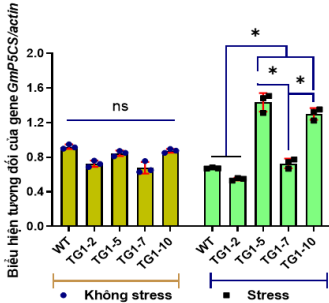


Hình 3.19. Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã của gene *GmDREB7* bằng phương pháp qRT-PCR ở các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 và cây WT trong điều kiện không xử lý stress và xử lý stress mặn.

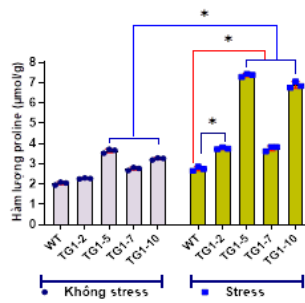
Trong điều kiện không xử lý stress mặn (Hình 3.19A), các dòng đậu tương chuyển gene TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10 đều ghi nhận mức độ phiên mã của gene *GmDREB7* cao hơn so với cây đối chứng (WT) ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy gene mục tiêu đã được biểu hiện ổn định trong các dòng chuyển gene TG1. Trong đó dòng TG1-5 và TG1-10 thể hiện mức cảm ứng mạnh hơn

3.3.2.3. Phân tích sự thay đổi hàm lượng proline ở các dòng đậu tương chuyển gene và cây đối chứng dưới điều kiện stress mặn

Kết quả phân tích qRT-PCR trình bày ở Hình 3.20 cho thấy sự khác biệt về mức độ phiên mã của gene *GmP5CS* giữa các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 và cây WT. Trong điều kiện không xử lý stress (Biểu đồ 3.20A), mức phiên mã của gene *GmP5CS* ở các dòng TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10 không có sự khác biệt, có ý nghĩa thống kê so với cây WT. Tuy nhiên, khi xử lý với stress mặn, tất cả các dòng chuyển gene đều thể hiện sự gia tăng mức độ phiên mã của *GmP5CS* so với cây WT ($p < 0,05$).



Hình 3.20. Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã gene *GmP5CS* ở bốn dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 và cây WT bằng phương pháp qRT-PCR.



Hình 3.21. Biểu đồ so sánh hàm lượng proline ở các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 với cây WT.

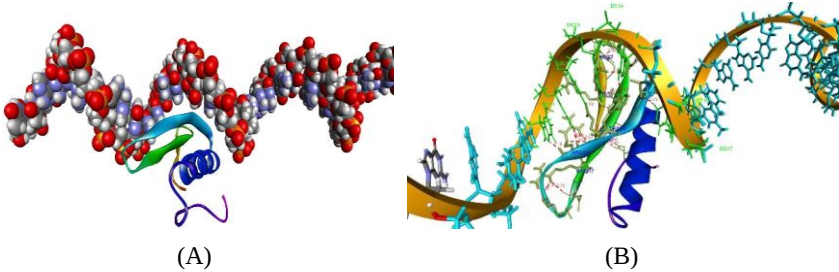
Kết quả phân tích hàm lượng proline ở điều kiện xử lý stress mặn, các dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7* và cây WT đều ghi nhận sự gia tăng hàm lượng proline so với điều kiện không xử lý, với mức tăng dao động từ 135,29 - 211,35% (Hình 3.21).

Sự biểu hiện quá mức của gene *GmDREB7* đã điều hoà gene *GmP5CS* tăng biểu hiện enzyme P5CS, thúc đẩy quá trình tích lũy proline dưới điều kiện stress mặn, qua đó góp phần nâng cao khả năng thích nghi và chịu stress mặn của các dòng đậu tương chuyển gene so với cây đối chứng.

3.3.3. Phân tích docking phân tử (*in silico*) giữa miền AP2 của protein DREB7 và vùng promoter của gene *GmP5CS*

Phân tích docking phân tử *in silico* trong nghiên cứu đã củng cố giả thuyết khi cho thấy các amino acid đặc trưng của miền AP2 (Arg2, Gly3, Arg5, Arg7, Trp9, Lys11, Glu15, Arg17, Arg24, Trp26 và Thr29) có khả năng hình thành các liên kết H ổn định với các yếu tố *cis* như GT-1, GCC và ACGTG ở vùng cuối promoter *GmP5CS*. Các kết quả

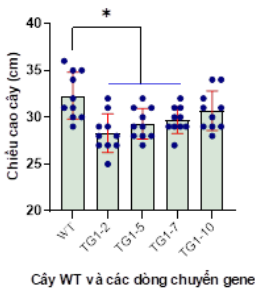
mô phỏng này phù hợp chặt chẽ với dữ liệu thực nghiệm về sự tăng cường biểu hiện *GmP5CS* và tích lũy proline ở các dòng mang *GmDREB7*, qua đó cung cấp cơ sở phân tử giải thích cho khả năng chịu mặn tốt hơn của các dòng chuyển gene.



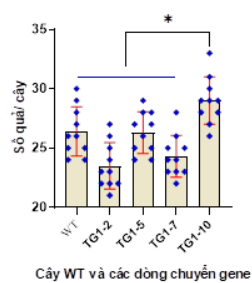
Hình 3.22. Mô hình tương tác phân tử và các tương tác liên kết hydro giữa miền AP2 với DNA đích (vùng promoter *GmP5CS*).

3.3.4. Đánh giá các dòng đậu tương chuyển gene triển vọng

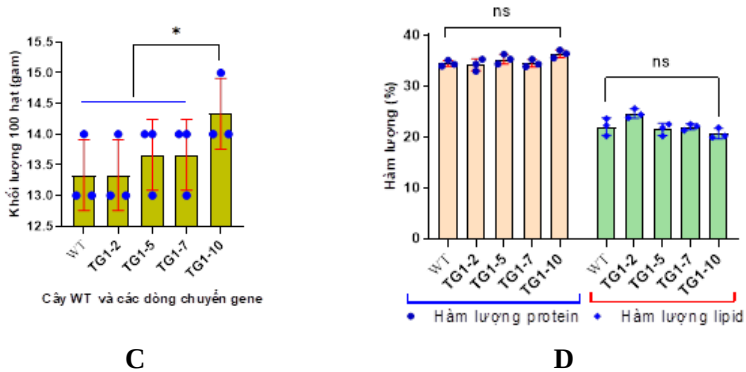
Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh hóa và sinh lý của các dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7* (Hình 3.23) cho thấy, nhìn chung các dòng chuyển gene không xuất hiện sự sai khác đáng kể về đặc điểm sinh trưởng và chất lượng hạt so với cây WT. Kết quả này cho thấy việc chuyển gene không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính nông sinh học cơ bản của cây đậu tương.



A



B



Hình 3.23. Biểu đồ so sánh một số đặc điểm hình thái và hóa sinh của các dòng đậu tương chuyển gene và cây WT.

(A) Chiều cao cây (cm), $n=10$; (B) Số quả/cây, $n=10$; (C) Khối lượng 100 hạt, $n=3$; (D) Hàm lượng protein (% khối lượng khô) và lipid (% khối lượng khô), $n=3$.

Về mặt hình thái, chiều cao cây của các dòng chuyển gene dao động trong khoảng từ 28,20 - 30,70 cm, thấp hơn so với cây WT (32,30 cm). Tuy nhiên, mức chênh lệch này không lớn và không làm thay đổi đáng kể kiểu hình sinh trưởng của cây. Đối với chỉ tiêu số quả chác/cây, các dòng TG1-2, TG1-5 và TG1-7 không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa so với cây WT, trong khi dòng TG1-10 đạt giá trị cao nhất (29,00 quả/cây), cao hơn so với cây WT (26,40 quả/cây; $p < 0,05$).

Về chỉ tiêu năng suất hạt, khối lượng 100 hạt của các dòng chuyển gene dao động trong khoảng từ 14,33 - 15,66 g và không khác biệt so với cây WT. Kết quả này cho thấy quá trình chuyển gene không ảnh hưởng đến kích thước và khối lượng hạt, qua đó khẳng định tính ổn định về mặt nông học của các dòng đậu tương chuyển gene mang gene *GmDREB7*.

Về thành phần hóa sinh của hạt, kết quả phân tích cho thấy hàm lượng protein và lipid ở hầu hết các dòng đậu tương chuyển gene không khác biệt so với cây WT ($p > 0,05$), phản ánh sự ổn định về chất lượng hạt sau quá trình chuyển gene. Đáng chú ý, dòng TG1-10 có hàm lượng protein cao nhất (36,28%), cao hơn so với cây WT (34,38%), trong khi

hàm lượng lipid ở các dòng chuyển gene nhìn chung không có thay đổi đáng kể, ngoại trừ dòng TG1-2 có xu hướng tăng nhẹ.

Ngược lại, sự khác biệt rõ rệt giữa các dòng chuyển gene và cây WT được thể hiện ở các chỉ tiêu sinh lý liên quan đến đáp ứng stress. Cụ thể, hàm lượng proline ở tất cả các dòng chuyển gene đều cao hơn cây WT dưới cả điều kiện stress hạn và stress mặn, với mức tăng đặc biệt rõ rệt ở hai dòng TG1-5 và TG1-10. Sau 09 ngày xử lý stress hạn, hàm lượng proline ở dòng TG1-10 đạt 5,87 $\mu\text{mol/g}$, cao hơn hơn hai lần so với cây WT (2,76 $\mu\text{mol/g}$). Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận dưới điều kiện stress mặn, với giá trị cao nhất ở dòng TG1-5 (7,37 $\mu\text{mol/g}$) và dòng TG1-10 (6,88 $\mu\text{mol/g}$).

Các kết quả về biểu hiện gene, sinh lý, sinh hóa và docking phân tử cho thấy *GmDREB7* đóng vai trò như một nhân tố phiên mã điều hòa dương con đường sinh tổng hợp proline thông qua kích hoạt *GmP5CS*, góp phần duy trì cân bằng nước nội bào và tăng cường khả năng chịu hạn, chịu mặn của cây đậu tương. Sự thống nhất giữa dữ liệu thực nghiệm và phân tích *in silico* khẳng định tiềm năng nổi bật của các dòng TG1-5 và TG1-10 như những ứng viên triển vọng cho các chiến lược cải tiến giống đậu tương bằng công nghệ chuyển gene hoặc chọn giống phân tử. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn cơ chế điều hòa trực tiếp của *GmDREB7*, cần tiếp tục triển khai các thí nghiệm xác minh ở mức phân tử như ChIP-qPCR hoặc EMSA trong các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Sự tiến hóa của họ gene *AP2*, phân họ *DREB* và miền *AP2* ở cây *A. thaliana* và đậu tương được thể hiện trên cây phát sinh chủng loại, được phân bố trong các nhóm đơn ngành và nhóm cận đơn ngành. Đã xác định được 18 gene *DREB* có vị trí trên 17 nhiễm sắc thể của đậu tương và 12 gene *DREB* trên 5 nhiễm sắc thể của *A. thaliana*. Miền *AP2* của các protein *DREB* đều chứa 11 vị trí amino acid liên kết với promoter, với 12 motif và phổ biến là RGRRWKERRWT hoặc RGRRSKERRWT. *GmDREB5* và *GmDREB7* thuộc hai nhánh tiến hóa khác nhau được chọn nhằm phân tích vai trò điều hòa các gene mục tiêu phản ứng với stress mặn.

1.2. Đã thiết kế gene và tạo được cấu trúc biểu hiện gene mã hóa protein DREB5 (*pFGC_GmDREB5*) thuộc phân họ nhân tố phiên mã AP2 của cây đậu tương. Cấu trúc mang gene *GmDREB5* của đậu tương được biến nạp thành công vào thuốc lá. Phân tích docking phân tử *in silico* cho thấy miền AP2 của protein DREB5 có khả năng liên kết với các trình tự *cis* trong vùng promoter của các gene mục tiêu. Dưới điều kiện stress mặn, sự biểu hiện của gene *GmDREB5* thúc đẩy phiên mã của *NtP5CS* và *NtSODFe*, làm tăng tích lũy proline ở cây thuốc lá chuyển gene.

1.3. Cấu trúc *pBI121_DREB7* chứa promoter *CaMV35S* và gene *GmDREB7* đã được biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT26 thông qua *A. tumefaciens*. Sự biểu hiện của gene *GmDREB7* làm tăng phiên mã của *GmP5CS* và thúc đẩy tích lũy proline ở cây đậu tương chuyển gene dưới điều kiện stress mặn. Bốn dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7* (TG1-2, TG1-5, TG1-7, TG1-10) đều thể hiện khả năng chịu mặn và chịu hạn vượt trội so với cây WT, trong đó TG1-5 và TG1-10 có mức chống chịu cao nhất.

2. Đề nghị

2.1. Tiếp tục nghiên cứu vai trò của gene *GmDREB5* trong việc nâng cao khả năng chịu hạn và chịu mặn ở đậu tương.

2.2. Tiếp tục đánh giá hai dòng đậu tương TG1-5 và TG1-10 ở các thể hệ tiếp theo nhằm chọn lọc dòng chuyển gene có khả năng chống chịu tốt, phục vụ làm nguồn vật liệu cho công tác chọn giống.

2.3. Có thể khai thác và ứng dụng các vector *pFGC_GmDREB5* và *pBI121_DREB7* trong chương trình cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn của đậu tương nói riêng và cây họ đậu nói chung.