

**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 ĐẠU TƯƠNG CHUYỂN GENE**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2026

**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 ĐẠY TƯƠNG CHUYỂN GENE**

**Ngành: Di truyền học
Mã số: 9420121**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

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

THÁI NGUYÊN - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân và GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Các kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án là trung thực và mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc. Một phần kết quả đã được công bố trên các tạp chí và hội nghị khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả, phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các kết quả đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng..... năm 2026

TÁC GIẢ

Nguyễn Thu Giang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu và PGS.TS. Nguyễn Hữu Quân đã tận tình định hướng, hướng dẫn và động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án. Sự chỉ dẫn khoa học nghiêm túc và hỗ trợ kịp thời của các thầy là nguồn động lực quan trọng giúp tôi vượt qua khó khăn và hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (NAFOSTED) thông qua đề tài mang mã số: 106.02-2023.05 do GS.TS. Chu Hoàng Mậu làm chủ nhiệm. Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của PGS.TS. Nguyễn Thị Hải Yến thông qua đề tài cấp Bộ Giáo dục & Đào tạo, mã số B2023-TNA-26.

Trong thời gian học tập và sinh hoạt tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên, tôi đã có cơ hội tiếp cận nhiều kiến thức chuyên sâu và phương pháp nghiên cứu hiện đại. Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và cán bộ của Bộ môn đã luôn hỗ trợ, đóng góp ý kiến quý báu và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và triển khai nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo, cán bộ thuộc Khoa Sinh học và Bộ phận Đào tạo Sau đại học thuộc Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã hỗ trợ, tạo môi trường học thuật thuận lợi và đồng hành cùng tôi trong suốt khóa học. Xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Y - Dược, Ban Chủ nhiệm khoa Khoa học Cơ bản, cùng các đồng nghiệp tại Bộ môn Sinh học đã tạo điều kiện và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập và công tác.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè, những người đã luôn động viên, chia sẻ và đồng hành cùng tôi trong suốt chặng đường học tập và nghiên cứu.

Thái Nguyên, tháng năm 2026

TÁC GIẢ

Nguyễn Thu Giang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÍ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC HÌNH	x
DANH MỤC BẢNG.....	xii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Những đóng góp mới của luận án	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. ĐẶC ĐIỂM HỌ NHÂN TỐ PHIÊN MÃ AP2 VÀ PHÂN HỌ DREB.....	5
1.1.1. Họ nhân tố phiên mã AP2	5
1.1.1.1. Đặc điểm của họ nhân tố phiên mã AP2.....	5
1.1.1.2. Sự phát sinh chủng loại của họ nhân tố phiên mã AP2.....	8
1.1.1.3. Vai trò của họ nhân tố phiên mã AP2	10
1.1.1.4. Họ nhân tố phiên mã AP2 ở đậu tương.....	11
1.1.2. Phân họ DREB	13
1.1.2.1. Đặc điểm của phân họ DREB	13
1.1.2.2. Sự phát sinh chủng loại của phân họ DREB	16
1.1.2.3. Đặc điểm cấu trúc gene <i>GmDREB5</i> và <i>GmDREB7</i>	18
1.1.3. Nhận xét	19
1.2. NGHIÊN CỨU CHỨC NĂNG GENE CỦA ĐẬU TƯƠNG Ở CÂY MÔ HÌNH	20
1.2.1. Nghiên cứu chức năng gene đậu tương ở cây mô hình thuốc lá.....	20
1.2.2. Nhận xét	22

1.3. VAI TRÒ VÀ ỨNG DỤNG CỦA GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ TRONG CẢI THIẾN KHẢ NĂNG KHÁNG HẠN, MẶN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG	23
1.3.1. Cây đậu tương và đặc tính chịu hạn, mặn ở cây đậu tương	23
1.3.1.1. Đặc điểm sinh học, nguồn gốc, giá trị kinh tế và dinh dưỡng ở cây đậu tương	23
1.3.1.2. Tác động của hạn và mặn đến sinh trưởng, phát triển ở đậu tương	26
1.3.1.3. Cơ chế chịu hạn và chịu mặn ở cây đậu tương	27
1.3.1.4. Đặc điểm của gene mã hoá enzyme P5CS và SODFe	29
1.3.1.5. Mô hình docking phân tử in silico	33
1.3.2. Chuyển gene mã hóa nhân tố phiên mã để tăng cường khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương	36
1.3.2.1. Chuyển gene gián tiếp qua <i>Agrobacterium</i>	36
1.3.2.2. Thành tựu của chuyển gene gián tiếp trong nâng cao khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương	38
1.3.2.3. Nghiên cứu biểu hiện gene <i>DREB</i> và tăng cường khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương	39
1.3.3. Nhận xét	43
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU	44
2.1.1. Vật liệu thực vật	44
2.1.2. Các chủng vi khuẩn và vector sử dụng trong nghiên cứu	44
2.1.3. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	44
2.1.4. Các trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu	45
2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN	46
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	46
2.3.1. Nhóm phương pháp tin sinh học	46
2.3.1.1. Thu thập dữ liệu về các gene thuộc họ AP2 và phân họ DREB	46
2.3.1.2. Phân tích đặc điểm và tiến hóa phân tử của các gene họ AP2, phân họ gene <i>DREB</i> và miền AP2 trong protein DREB	46

2.3.2. Nhóm phương pháp thiết kế gene, vector chuyển gene và chuyển gene gián tiếp qua <i>A. tumefaciens</i>	46
2.3.2.1. Thiết kế vector chuyển gene và tạo chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp.....	46
2.3.2.2. Chuyển gene gián tiếp vào thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i>	48
2.3.2.3. Chuyển gene gián tiếp vào đậu tương thông qua <i>A. tumefaciens</i>	49
2.3.3. Nhóm phương pháp phân tích biểu hiện gene	50
2.3.3.1. Phương pháp xử lý dòng chuyển gene bằng stress mặn.....	50
2.3.3.2. Phương pháp xác định sự có mặt của gene chuyển.....	51
2.3.3.3. Phân tích sự biểu hiện của gene chuyển	52
2.3.3.4. Đánh giá chức năng sinh học của gene chuyển	53
2.3.4. Phương pháp docking phân tử	54
2.3.5. Các phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu	56
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	57
3.1. TIẾN HÓA PHÂN TỬ CỦA HỌ GENE AP2 Ở CÂY <i>A. thaliana</i> VÀ ĐẬU TƯƠNG	57
3.1.1. Sự tiến hóa của họ gene <i>AP2</i> ở cây <i>A. thaliana</i> và đậu tương	57
3.1.2. Tiến hóa của phân họ gene <i>DREB</i> ở <i>A. thaliana</i> và ở đậu tương	60
3.1.3. Đặc điểm miền <i>AP2</i> trong protein <i>DREB</i> của cây <i>A. thaliana</i> và ở đậu tương.....	62
3.1.4. Thảo luận kết quả.....	65
3.2. NGHIÊN CỨU CHỨC NĂNG CỦA GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ <i>DREB5</i> CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG	67
3.2.1. Thiết kế gene và vector biểu hiện <i>GmDREB5</i>	68
3.2.1.1. Thiết kế gene <i>GmDREB5</i>	68
3.2.1.2. Thiết kế vector biểu hiện gene <i>GmDREB5</i>	70
3.2.2. Biến nạp cấu trúc biểu hiện gene <i>GmDREB5</i> và sàng lọc các dòng thuốc lá mang <i>GmDREB5</i>	72
3.2.2.1. Biến nạp cấu trúc mang gene <i>GmDREB5</i> vào cây thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i>	72

3.2.2.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp <i>GmDREB5</i> ở cây thuốc lá chuyển gene thể hệ TG0.....	75
3.2.3. Phân tích mối quan hệ giữa gene <i>GmDREB5</i> và mức độ phiên mã của một số gene mục tiêu ở cây thuốc lá.....	76
3.2.3.1. Ảnh hưởng của sự biểu hiện <i>GmDREB5</i> đến mức độ phiên mã của gene <i>NtP5CS</i> và <i>NtSODFe</i> ở cây thuốc lá chuyển gene.....	76
3.2.3.2. Mối quan hệ giữa mức độ phiên mã của gene <i>NtP5CS</i> và hàm lượng proline ở các dòng thuốc lá chuyển gene	80
3.2.4. Docking phân tử giữa miền AP2 của protein DREB5 và vùng promoter của một số gene mục tiêu.....	82
3.2.5. Thảo luận kết quả.....	86
3.3. VAI TRÒ CỦA GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB7 Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG.....	88
3.3.1. Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene <i>GmDREB7</i> vào cây đậu tương và tạo cây đậu tương chuyển gene	89
3.3.1.1. Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene <i>GmDREB7</i> vào cây đậu tương	89
3.3.1.2. Xác định sự có mặt của gene chuyển <i>GmDREB7</i> trong hệ gene ở các cây đậu tương được chuyển gene ở thể hệ TG0	92
3.3.2. Phân tích các dòng đậu tương chuyển gene	93
3.3.2.1. Đánh giá các dòng chuyển gene thể hệ TG1 dưới điều kiện stress mặn.....	93
3.3.2.2. Phân tích mức độ phiên mã của <i>GmDREB7</i> ở dòng đậu tương chuyển gene và cây WT sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl.....	95
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.....	97
3.3.3. Phân tích docking phân tử (<i>in silico</i>) giữa miền AP2 của protein DREB7 và vùng promoter của gene <i>GmP5CS</i>	100
3.3.4. Đánh giá các dòng đậu tương chuyển gene triển vọng	102
3.3.4.1. Phân tích khả năng chịu hạn và chịu mặn của các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1.....	102

3.3.4.2. Đặc điểm hình thái và hóa sinh hạt của hạt ở một số dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1.....	105
3.3.5. Thảo luận kết quả	108
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	111
1. Kết luận	111
2. Đề nghị	111
TÀI LIỆU THAM KHẢO	114
PHỤ LỤC	129

DANH MỤC KÍ HIỆU, TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ/chữ viết tắt	Tiếng Anh
AP2/ERF	APETALA2/Ethylene Responsive Factor
ABA	Absciscic Acid
AS	Acetosyringone
APX	Ascorbate peroxidase
bp	Base pair
BAP	6-Benzyl Amino Purin
CAT	Catalase
CCM	Co-cultivation medium
cs	
CRT	C-repeat responsive element
DREB	Dehydration-responsive element-binding protein
DRE	Dehydration-responsive element
Da, KDa	Dalton, kilodalton
DHAR	Dehydroascorbate reductase
GSH	Glutathione
GPX	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S-transferase
GDH	Glutamate dehydrogenase
GA ₃	Gibberellic acid
GR	Glutathione reductase
GmDREB7A	<i>Glycine max</i> Dehydration responsive element binding protein 7A
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
JA	Jasmonic acid
Kin	Kinetin
MS	Murashige và Skoog, 1962
MDA	Malondialdehyd
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase
NAA	Naphthalene acetic acid
NLS	Nuclear localization sequence
OD	Optical density

POD	Peroxidase
PCR	Polymerase chain reaction
RM	Rooting medium
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide dismutase
SEM	Shoot elongation medium
SIM	Shoot induction medium
TAOC	Total Antioxidant capacity
<i>Taq</i> DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase
WGD	Whole genome duplication
WT	Wild type
TG0	Transgenic generation (TG) plants are created from genetic transformed samples <i>in vitro</i>
TG1	Transgenic plants (TG) germinate from seeds of TG0 plants

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Phân loại và đặc điểm cấu trúc họ nhân tố phiên mã AP2	6
Hình 1.2. Sơ đồ biểu diễn sự tiếp nhận tín hiệu stress từ ngoại cảnh và biểu hiện gene thông qua con đường phụ thuộc và không phụ thuộc ABA	15
Hình 1.3. Vị trí của gene <i>GmDREB5</i> (LOC100809887) trên nhiễm sắc thể số 13	18
Hình 1.4. Vị trí của gene <i>GmDREB7</i> (LOC100101894) trên nhiễm sắc thể số 20.....	19
Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật bậc cao.....	31
Hình 3.1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa phân tử của các thành viên của họ gene AP2 ở <i>A. thaliana</i> và đậu tương theo phương pháp ML và JTT maxtrix-based model trong MEGA	59
Hình 3.2. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa phân tử của các thành viên của phân họ gene <i>DREB</i> ở <i>A. thaliana</i> và đậu tương theo phương pháp ML và JTT maxtrix-based model trong MEGA.	61
Hình 3.3. Sơ đồ phát sinh chủng loại miền AP2 của phân họ protein DREB5 và DREB7 ở cây <i>A. thaliana</i> và đậu tương theo phương pháp Maximum likelihood.....	65
Hình 3.4. Trình tự nucleotide của gene <i>GmDREB5</i> chứa điểm cắt của enzyme <i>AscI</i> và <i>BamHI</i> ; trình tự mã hoá cmyc và KDEL.	68
Hình 3.5. Sơ đồ vector tái tổ hợp <i>pTWIST_GmDREB5-syn</i>	69
Hình 3.6. Cấu trúc của vector biểu hiện <i>pFGC_GmDREB5</i>	70
Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra khuôn lạc.	71
Hình 3.8. Hình ảnh biến nạp di truyền, tái sinh, chọn lọc <i>in vitro</i> và tạo cây thuốc lá chuyển gene.....	72
Hình 3.9. Các dòng chuyển gene <i>GmDREB5</i> và cây WT (Wild Type) trong điều kiện không có stress và stress muối, cùng với kết quả phân tích RT-PCR và Western blot	75

Hình 3.10. Sự thay đổi mức độ phiên mã của gene <i>GmDREB5</i> giữa các dòng thuốc lá chuyển gene và cây WT trong điều kiện không bị stress và stress mặn.	77
Hình 3.11. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của gene <i>NtP5CS</i> (A) và <i>NtSODFe</i> (B) trong các dòng thuốc lá chuyển gene <i>GmDREB5</i> dưới điều kiện không bị stress và stress mặn.	79
Hình 3.12. Sự thay đổi mức độ phiên mã của gene <i>NtP5CS</i> và hàm lượng proline giữa dòng thuốc lá chuyển gene TG08 và cây WT trong điều kiện không bị stress và stress mặn.	81
Hình 3.13. Mô hình thiết kế docking phân tử giữa vùng AP2 của protein GmDREB5 và các motif tác động <i>cis</i> của promoter gene <i>NtP5CS</i> và <i>NtSODFe</i>	84
Hình 3.14. Mô hình liên kết AP2 - promoter và mạng lưới liên kết hydrogen (H) giữa AP2 và DNA.	85
Hình 3.15. Sơ đồ cấu trúc vector pBI121_ <i>GmDREB7</i>	90
Hình 3.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh <i>in vitro</i> và tạo cây đậu tương chuyển gene.	91
Hình 3.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác nhận sự có mặt của gene chuyển <i>GmDREB7</i> trong các cây đậu tương chuyển gene TG0.	92
Hình 3.18. Hình ảnh cây đậu tương chuyển gene ở thế hệ TG1 và cây đối chứng trong điều kiện tưới nước và xử lý stress mặn.	94
Hình 3.19. Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã của gene <i>GmDREB7</i> bằng phương pháp qRT-PCR ở các dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 và cây WT trong điều kiện không xử lý stress và xử lý stress mặn.	96
Hình 3.20. Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã gene <i>GmP5CS</i> ở bốn dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 và cây WT bằng phương pháp qRT-PCR.	98
Hình 3.21. Biểu đồ so sánh hàm lượng proline của các dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 với cây WT.	99
Hình 3.22. Mô hình tương tác phân tử và các tương tác liên kết hydrogen giữa miền AP2 với DNA đích (vùng promoter <i>GmP5CS</i>).	101
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.	106

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các gene <i>DREB</i> được sử dụng trong chuyển gene nhằm nâng cao khả năng chống chịu stress phi sinh học ở cây trồng và đậu tương	42
Bảng 2.1. Thông tin về trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR.....	45
Bảng 2.2. Đặc điểm và trình tự của các vùng AP2 của protein GmDREB, vị trí liên kết DNA, vùng khởi động của các gene <i>NtP5CS</i> , <i>NtSODFe</i> và các motif tác động <i>cis</i>	55
Bảng 3.1. Các dạng amino acid của miền AP2 trong protein DREB liên kết với trình tự <i>cis</i> của promoter	63
Bảng 3.2. Kết quả biến nạp cấu trúc pFGC_GmDREB5 vào thuốc lá.....	73
Bảng 3.3. Các giá trị docking phân tử của phức hợp AP2-promoter SODFe và AP2-promoter P5CS	82
Bảng 3.4. Các giá trị docking phân tử của phức hợp AP2 - GmP5CS	102
Bảng 3.5. So sánh khả năng chịu hạn, chịu mặn của các dòng chuyển gene và WT ...	104
Bảng 3.6. Đặc điểm của một số dòng đậu tương chuyển gene <i>GmDREB7</i>	107

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 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 - nhân tố phiên mã 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 mặn và chịu hạn.

4. Những đóng góp mới của luận án

4.1. Luận án đã xác định được vai trò điều hòa của gene *GmDREB5* 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 độ 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 mặn và chịu hạn 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 mặn, hạn của cây đậu tương bằng kỹ thuật tăng cường biểu hiện gene. Nghiên cứu đã mở ra hướng tiếp cận ứng dụng công nghệ gene trong cải tiến giống cây trồng góp phần trong việc ứng phó với biến đổi khí hậu hiện nay.

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 khả năng chống chịu của cây trồng theo hướng 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.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐẶC ĐIỂM HỌ NHÂN TỔ PHIÊN MÃ AP2 VÀ PHÂN HỌ DREB

1.1.1. Họ nhân tổ phiên mã AP2

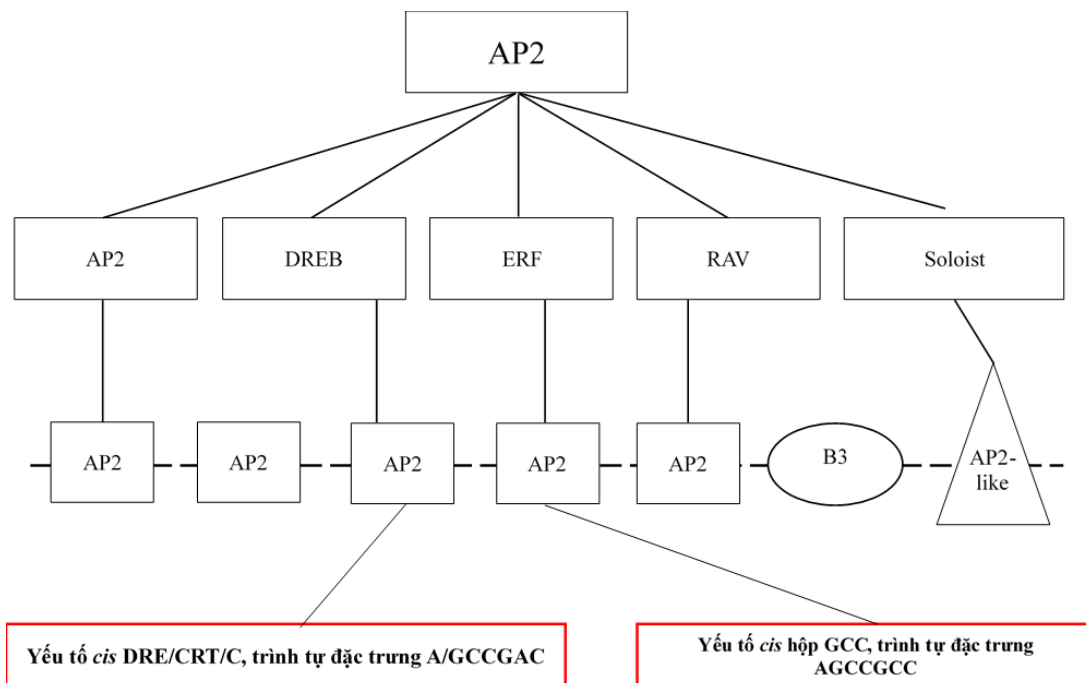
1.1.1.1. Đặc điểm của họ nhân tổ phiên mã AP2

Các yếu tố bất lợi phi sinh học như hạn, mặn, nhiệt độ ... có tác động tiêu cực đến sinh trưởng, phát triển cũng như năng suất của thực vật. Để thích nghi với những điều kiện này, thực vật đã tiến hóa các cơ chế đáp ứng phức tạp, bao gồm tiếp nhận tín hiệu stress, kích hoạt các con đường truyền tín hiệu phụ thuộc hoặc không phụ thuộc hormone, từ đó điều chỉnh biểu hiện gene nhằm duy trì cân bằng nội môi và khả năng sống sót.

Các gene liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học ở thực vật được phân loại thành hai nhóm chính. Nhóm gene điều hòa mã hóa các protein tham gia vào hệ thống nhận biết và truyền tín hiệu, đồng thời kiểm soát sự hoạt hóa hoặc ức chế biểu hiện của các gene đáp ứng stress. Nhóm gene còn lại là các gene chức năng, chịu trách nhiệm mã hóa các protein trực tiếp tham gia vào cơ chế bảo vệ tế bào và tăng cường khả năng thích nghi của cây trong điều kiện môi trường bất lợi [125]. Trong số các gene điều hòa, các nhân tổ phiên mã (transcription factors - TF) như AP2, NAC, MYB, WRKY và bZIP đóng vai trò chủ đạo trong việc thiết lập và điều phối mạng lưới điều hòa biểu hiện gene ở mức phiên mã. Ngược lại, các gene chức năng chủ yếu mã hóa các hợp chất và protein tham gia duy trì cân bằng thẩm thấu, ổn định cấu trúc tế bào và giảm thiểu tổn thương oxy hóa, bao gồm các chất thẩm thấu tương thích (proline, đường hòa tan), protein LEA và dehydrin, các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), cũng như các protein kênh nước, qua đó góp phần nâng cao khả năng chịu stress của thực vật.

Trong hệ thống các nhân tổ phiên mã ở thực vật, họ AP2 được xếp vào nhóm có quy mô lớn và mức độ bảo tồn cao, có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát các quá trình phát triển cũng như khả năng thích nghi của cây trước những biến động bất lợi của môi trường. Việc phân loại họ này chủ yếu dựa trên đặc điểm cấu

trúc của miền AP2 bảo tồn và sự hiện diện của miền B3, theo đó họ AP2/ERF được chia thành năm phân họ gồm: AP2, DREB (Dehydration-Responsive Element Binding), ERF (Ethylene-Responsive Factor), RAV (Related to ABI3/VP) và Soloist [35].



Hình 1.1. Phân loại và đặc điểm cấu trúc họ nhân tố phiên mã AP2 [35].

□ Miền AP2 ○ Miền B3 △ Miền AP2-like

Theo hình 1.1 các thành viên thuộc phân họ AP2 mang hai miền AP2 đặc trưng và phần lớn liên quan đến các quá trình phát triển như biệt hóa cơ quan sinh sản, hình thành phôi và phát triển hạt. Ngược lại, hai phân họ DREB và ERF chỉ chứa một miền AP2, song chiếm ưu thế về số lượng và tham gia trực tiếp vào mạng lưới điều hòa phản ứng stress phi sinh học và sinh học. Phân họ DREB có chức năng chủ yếu trong điều hòa đáp ứng với hạn, mặn và lạnh thông qua khả năng gắn đặc hiệu vào các trình tự *cis* DRE/CRT tại vùng promoter của gene mục tiêu. Trong khi đó, phân họ ERF tham gia chủ yếu vào các con đường tín hiệu phụ thuộc ethylene và cơ chế phòng vệ, chống lại tác nhân gây bệnh. Phân họ RAV được đặc trưng bởi sự kết hợp của một miền AP2 và một miền B3, được cho là có liên quan đến điều hòa phát triển chồi, thời điểm ra hoa, quá trình lão hóa lá, cũng như phản ứng trước stress môi trường. Phân họ Soloist bao gồm

số lượng gene hạn chế, chỉ chứa một miền AP2 với mức độ sai khác trình tự đáng kể so với các nhóm còn lại và được giả định có vai trò trong khả năng chịu mặn và phản ứng trước sự xâm nhiễm của mầm bệnh [35].

Gene AP2 đầu tiên được nhận diện ở loài thực vật mô hình *A. thaliana* và được chứng minh có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát phát triển hoa, với đặc điểm cấu trúc là sự hiện diện của hai miền AP2 bảo tồn [49]. Tiếp theo đó, các protein thuộc phân họ ERF đã được phân lập đầu tiên từ cây thuốc lá thông qua khả năng liên kết đặc hiệu với các yếu tố đáp ứng ethylene nằm trong vùng khởi động của các gene liên quan đến stress sinh học. Những phát hiện này không chỉ làm sáng tỏ cơ chế hoạt động của các ERF trong điều hòa phiên mã mà còn khẳng định tính đa dạng về chức năng của họ nhân tố phiên mã AP2/ERF trong điều hòa biểu hiện gene ở thực vật [85].

Về mặt cấu trúc, các protein thuộc họ AP2/ERF được phân thành nhiều vùng chức năng khác nhau, bao gồm miền liên kết DNA, miền tham gia điều hòa phiên mã, vùng liên quan đến quá trình hình thành phức protein và tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal - NLS). Trong số đó, miền liên kết DNA là vùng có mức độ bảo tồn cao nhất, với chiều dài khoảng 60 - 70 amino acid và có khả năng gấp cuộn tạo nên cấu trúc không gian ba chiều ổn định gồm ba phiến gấp β và một xoắn α [35]. Phân tích trình tự cho thấy miền này chứa hai motif đặc trưng là YRG và RAYD. Motif YRG nằm ở phía đầu N của miền, bao gồm khoảng 19 - 22 amino acid giàu tính ưa nước, đóng vai trò quan trọng trong việc nhận diện và liên kết với các base nitơ cũng như các nhóm phân cực trên phân tử DNA. Trong khi, motif RAYD phân bố ở đầu C, dài khoảng 42 - 43 amino acid, có chức năng hình thành các cấu trúc xoắn α , từ đó tham gia vào tương tác protein - protein hoặc hỗ trợ sự gắn kết bổ sung với DNA thông qua bề mặt kỵ nước [35].

Yếu tố *cis* DRE/CRT được xem là đích gắn kết quan trọng của các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF trong cơ chế điều hòa đáp ứng của thực vật đối với stress phi sinh học. Ở loài mô hình *A. thaliana*, gene đáp ứng stress điển hình như Responsive to Desiccation 29A (*RD29A*) (còn được biết đến với tên COR78/LTI78) cho thấy mức độ cảm ứng mạnh khi cây chịu tác động của các điều kiện môi trường

bất lợi [114]. Đáng chú ý, sự điều hòa biểu hiện của *RD29A* diễn ra thông qua cả hai con đường phụ thuộc và không phụ thuộc vào abscisic acid (ABA). Các nghiên cứu phân tích vùng promoter đã chỉ ra rằng con đường phụ thuộc ABA được điều khiển trung gian bởi yếu tố ABA - responsive element (ABRE), trong khi không phụ thuộc ABA chịu sự kiểm soát của yếu tố dehydration - responsive element (DRE), mang trình tự bảo tồn TACCGACAT [115]. Phân họ DREB giữ vai trò thiết yếu trong việc kích hoạt phản ứng thích nghi của thực vật trước các stress phi sinh học như hạn, mặn và lạnh thông qua khả năng nhận diện các yếu tố *cis* kiểu DRE chứa motif lõi A/GCCGAC. Trái lại, các thành viên thuộc phân họ ERF thường tham gia điều hòa đáp ứng với stress sinh học, đặc biệt là các phản ứng phòng vệ trước sự xâm nhiễm của mầm bệnh, thông qua sự liên kết với yếu tố GCC- box có trình tự đặc trưng AGCCGCC [4]. Bên cạnh khả năng gắn với các yếu tố DRE/CRT và ERE, các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF còn thể hiện khả năng tương tác với nhiều yếu tố điều hòa khác bao gồm coupling element 1 (CE1, TGCCACCG), coupling element 3 (CE3, CGCG) và yếu tố phản ứng thiếu oxy (HRPE) vốn tham gia vào các quá trình sinh lý và đáp ứng môi trường đa dạng. Ngoài ra, một số trình tự *cis* khác như CAACA, ATCTA, CATGCA, CGNCCA và ATCGAG cũng được ghi nhận là có khả năng tương tác với các protein AP2/ERF, qua đó phản ánh chức năng đa dạng và linh hoạt của họ gene AP2 trong điều kiện sinh trưởng bình thường cũng như khi cây đối mặt với stress môi trường [35].

1.1.1.2. Sự phát sinh chủng loại của họ nhân tố phiên mã AP2

Về phân loại và lịch sử tiến hóa, các gene mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ AP2 được sắp xếp thành bốn phân họ chính dựa trên phân tích cây phát sinh loài. Kết quả này cho thấy họ AP2 bao gồm các thành viên có nguồn gốc từ nhiều nhánh tiến hóa khác nhau của giới thực vật, đại diện bởi các loài mô hình như *A. thaliana* (thuộc nhóm thực vật hạt kín), *Selaginella moellendorffii* (thuộc nhóm thực vật có mạch), *Physcomitrium patens* (rêu) và *Chlamydomonas reinhardtii* (tảo lục) [73]. Sự hiện diện của các thành viên AP2 trong các nhóm thực vật có mức độ tiến hóa khác nhau phản ánh tính bảo tồn cao cũng như vai trò nền tảng của họ gene này trong quá trình tiến hóa và thích nghi của thực vật trên cạn.

Phân tích cây phát sinh loài cho thấy các gene có nguồn gốc từ *Physcomitrium patens* và *S. moellendorffii* phân bố trong cả bốn phân họ chính của họ AP2, đồng thời cũng xuất hiện trong một nhánh riêng biệt chứa các gene tương đồng với gene AT4G13040. Bên cạnh đó, các trình tự từ hai loài này được ghi nhận trong phần lớn các phân nhóm con, ngoại trừ các nhóm A-1 và B-2. Cho thấy mối quan hệ tiến hóa chặt chẽ giữa rêu và thực vật có mạch, đồng thời gợi ý khả năng hai nhóm này có nguồn gốc từ một tổ tiên chung trong quá trình tiến hóa sớm của thực vật trên cạn [73].

Phân nhóm A-1 (còn gọi là nhóm DREB1) thể hiện mối quan hệ phát sinh loài gần gũi với phân nhóm A-4, đồng thời có chung nguồn gốc tiến hóa với phân nhóm A-5. Đáng chú ý, các gene thuộc phân nhóm A-1 không được ghi nhận ở các loài thực vật hạt trần. Như vậy, phân nhóm này có thể đã hình thành tương đối muộn và mang tính đặc thù trong quá trình tiến hóa của thực vật hạt kín [73].

Đối với loài *C. reinhardtii*, kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy các gene mã hóa nhân tố phiên mã AP2 của loài này được phân bố trên bốn nhánh riêng biệt, trong đó hai nhánh thuộc phân họ ERF và hai nhánh còn lại thuộc phân họ AP2. Tuy nhiên, sự vắng mặt của các gene thuộc phân họ RAV trong hệ gene của *C. reinhardtii* gợi ý rằng phân họ này có thể đã hình thành muộn hơn, gắn liền với sự xuất hiện và đa dạng hóa của các nhóm thực vật có phôi [73].

Sakuma và cs (2002) đã nghiên cứu phân tích phát sinh loài đối với các thành viên thuộc họ nhân tố phiên mã AP2 ở loài *A. thaliana* dựa trên mức độ tương đồng của trình tự miền AP2 bảo tồn. Trên cơ sở đó, 145 gene được xác định trong hệ gene của *A. thaliana* đã được sắp xếp thành năm nhóm chính, bao gồm phân họ AP2 (với 17 gene), phân họ RAV (gồm 6 gene), phân họ CBF/DREB (với 56 gene), phân họ ERF (gồm 65 gene), cùng một gene riêng lẻ được ký hiệu là AL079349 [94].

Các gene mã hóa nhân tố phiên mã (transcription factors, TFs) thuộc họ AP2 đã được chứng minh giữ vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sinh trưởng, phát triển của thực vật cũng như điều hòa phản ứng thích nghi trước các stress phi sinh học [115]. Trong những năm gần đây, việc nhận diện và phân tích toàn diện các thành viên của họ gene AP2 ở quy mô hệ gene đã được triển khai trên nhiều loài

thực vật khác nhau, qua đó cho thấy sự biến động đáng kể về số lượng gene giữa các loài. Cụ thể, số lượng gene AP2 được ghi nhận lần lượt là 121 ở lúa mạch, 146 ở cà chua, 147 ở lúa, 130 ở đậu tương, 271 ở lúa mì cứng, 178 ở cà tím, 172 ở cò dầu và 149 ở nho [77], [111], [117], [121].

1.1.1.3. Vai trò của họ nhân tố phiên mã AP2

Các dạng stress phi sinh học như hạn, mặn, nhiệt độ, mất cân bằng dinh dưỡng và kim loại nặng được xem là những tác nhân môi trường chủ yếu chi phối quá trình sinh trưởng, phát triển, năng suất, cũng như chất lượng của cây trồng. Trải qua quá trình tiến hóa lâu dài, thực vật đã hình thành và hoàn thiện các hệ thống điều hòa phức tạp nhằm duy trì cân bằng nội môi và nâng cao khả năng thích nghi trước các điều kiện bất lợi. Trong bối cảnh đó, các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2, bao gồm các phân họ DREB và ERF được xác định là tham gia rộng rãi vào việc điều hòa quá trình biểu hiện gene liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học ở thực vật.

Các nhân tố phiên mã AP2 phản ứng với stress hạn

Nước không chỉ đóng vai trò là nguyên liệu mà còn là môi trường không thể thiếu cho các phản ứng trao đổi chất diễn ra trong tế bào. Ở thực vật, nước giữ vai trò trung tâm trong quá trình quang hợp. Khi thiếu nước biểu hiện đầu tiên ở cây là hiện tượng héo lá và trong những trường hợp nghiêm trọng có thể gây chết cây.

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã làm rõ vai trò điều hòa của các gene thuộc họ AP2 trong đáp ứng của thực vật đối với stress. Yu và cs (2022) cho rằng việc biểu hiện quá mức gene *TaERF-6-3A* ở *A. thaliana* làm tăng tính miễn cảm của cây đối với hạn hán và stress mặn, hiện tượng này đồng thời đi kèm với sự ức chế của các gene liên quan đến stress và hệ thống chống oxy hóa [121]. Tương tự, Jarambasa và cs (2023) ghi nhận sự cảm ứng của các gene *DREB2A*, *DREB2C*, *DREB2E* và *DREB2F* trong lá đậu xanh khi cây chịu điều kiện khan hiếm nước [47]. Ngược lại, một số thành viên khác của họ AP2 được chứng minh có vai trò tích cực trong việc tăng cường khả năng chịu hạn. Kumar và cs (2022) chứng minh rằng việc biểu hiện quá mức dòng *OsAP2/ERF-N22* ở lúa dẫn đến sự cải thiện đáng kể các chỉ tiêu sinh lý quan trọng, bao gồm hàm lượng nước tương đối, chỉ số ổn định màng tế bào, thế năng thẩm thấu và độ dẫn khí khổng [55]. Bên cạnh đó, Yang

và cs (2022) đã xác định được 119 gene thuộc họ CoAP2/ERF trong hệ gene cây đay đen (*Corchorus olitorius*), trong đó các gene *CoDREB-11*, *CoDREB-14* và *CoRAV-01* thể hiện mức biểu hiện tăng cao rõ rệt dưới điều kiện hạn và stress mặn [117]. Ở cây dương (*Populus tomentosa*), gene *PtoERF15* được xác định là một nhân tố quan trọng trong đáp ứng với stress thẩm thấu thông qua điều hòa biểu hiện gene mục tiêu *PtoMYC2b*, vốn liên quan đến việc kiểm soát các đặc điểm giải phẫu của lá như kích thước, mật độ và độ dày thành tế bào. Việc biểu hiện quá mức *PtoERF15* giúp duy trì tiềm năng nước của cây, từ đó góp phần nâng cao khả năng chịu hạn [54].

Các nhân tố phiên mã AP2 phản ứng với stress mặn

Đất bị nhiễm mặn hiện chiếm khoảng 6% tổng diện tích đất trên toàn thế giới. Sự tích lũy muối hòa tan ở nồng độ cao trong đất gây ra tác động bất lợi nghiêm trọng đối với cây trồng, bao gồm độc tính ion, rối loạn cân bằng thẩm thấu, làm suy giảm quá trình sinh trưởng, phát triển từ đó dẫn đến giảm năng suất. Huang và cs (2021) đã xác định nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF19 (*OsERF19*) đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng của cây đối với stress mặn. Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện mặn làm giảm mức biểu hiện của gene *OsERF19*; tuy nhiên, việc tăng cường biểu hiện gene này giúp nâng cao đáng kể khả năng chịu mặn của cây. Cụ thể, dòng lúa biểu hiện quá mức *OsERF19* thể hiện sự gia tăng biểu hiện của nhiều gene liên quan đến cơ chế bảo vệ và thích nghi với mặn, bao gồm *OsLEA3* (gene mã hóa protein LEA), *OsNHX1* (gene mã hóa protein trao đổi Na^+/H^+ tại không bào), *OsHKT6* (gene liên quan đến vận chuyển Na^+ ái lực thấp) và *OsOTS1* (gene liên quan đến cơ chế chống chịu mặn) khi cây được xử lý trong điều kiện stress muối [45].

1.1.1.4. Họ nhân tố phiên mã AP2 ở đậu tương

Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng trong các điều kiện môi trường bất lợi phụ thuộc lớn vào sự hoạt động của các cơ chế di truyền ở nhiều cấp độ khác nhau. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng về mức độ và tính phức tạp, việc cải thiện khả năng thích nghi và chống chịu với các yếu tố bất lợi phi sinh học thông qua chiến lược chọn giống dựa trên cải tiến di truyền đang trở

thành một hướng nghiên cứu trọng tâm, đặc biệt đối với cây đậu tương. Các nhân tố phiên mã giữ vai trò then chốt trong việc kiểm soát mạng lưới biểu hiện gene, qua đó điều hòa các quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật.

Wang và cs (2022) đã tiến hành phân tích toàn diện hệ gene đậu tương và xác định có 301 gene thuộc họ *GmAP2*, phân bố rộng khắp trên toàn bộ 20 nhiễm sắc thể. Dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài kết hợp với so sánh trình tự, các protein mã hóa bởi những gene này được chia thành nhiều phân họ khác nhau. Cụ thể, 44 protein mang hai miền bảo tồn AP2 được xếp vào phân họ AP2, trong khi 4 protein chứa đồng thời một miền AP2 và một miền B3 được phân loại vào phân họ RAV. Bên cạnh đó, có 98 protein được xác định thuộc phân họ DREB và 153 protein thuộc phân họ ERF. Ngoài các nhóm trên, hai gene *GmAP2/ERF300* và *GmAP2/ERF301* thể hiện mức độ tương đồng trình tự cao với gene *AT4G13040* và được xếp vào phân họ Soloist. Các protein thuộc họ *GmAP2* có chiều dài chuỗi amino acid biến thiên trong khoảng từ 144 đến 710 amino acid, tương ứng với khối lượng phân tử dao động từ 15,96 đến 77,51 kDa. Đáng chú ý, cấu trúc gene giữa các phân họ thể hiện sự khác biệt rõ rệt, đặc biệt về số lượng intron. Phần lớn các gene thuộc hai phân họ *DREB* và *ERF* gần như không chứa intron; ngược lại, các gene thuộc phân họ *AP2* và *Soloist* có cấu trúc phức tạp hơn, với số lượng intron dao động từ ba đến chín. Trong khi đó, các gene thuộc phân họ *RAV* không ghi nhận sự hiện diện của intron [111].

Zhao và cs (2017) đã tiến hành phân tích hệ gene đậu tương và nhận diện được 13 gene thuộc phân họ *RAV*, mã hóa các polypeptide có chiều dài dao động từ 288 đến 582 amino acid. Các gene này phân bố tương đối đồng đều trên các nhiễm sắc thể, với mỗi nhiễm sắc thể chỉ mang từ một đến hai gene. Khi so sánh với *A. thaliana*, sự phân bố của các gene *RAV* ở loài mô hình này thể hiện xu hướng tập trung rõ rệt hơn, trong đó nhiễm sắc thể số 1 chứa tới sáu bản sao, các nhiễm sắc thể còn lại chỉ chứa từ một đến ba bản sao. Phân tích cấu trúc gene cho thấy, ở đậu tương, khoảng 46,15% số gene *RAV* không chứa intron, trong khi 53,85% còn lại có cấu trúc gồm một intron [127].

Trong nghiên cứu tiếp theo, Zhao và cs (2019) đã xác định tổng cộng 160 gene thuộc phân họ *ERF* trong hệ gene đậu tương, được phân bố trên toàn bộ 20 nhiễm sắc thể. Mặc dù hiện diện trên tất cả các nhiễm sắc thể, các gene *ERF* phân bố

không đồng đều, với số lượng cao nhất được ghi nhận trên nhiễm sắc thể số 13 (với 17 gene), trong khi nhiễm sắc thể số 12 chỉ chứa 03 gene. Dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài, các protein ERF này được phân chia thành tám nhóm riêng biệt (từ nhóm I đến nhóm VIII), trong đó nhóm I chiếm ưu thế về số lượng, còn nhóm IV là nhóm có ít trình tự nhất, chỉ gồm chín protein [128].

Thực vật phát triển nhiều cơ chế thích nghi nhằm đối phó với các yếu tố stress phi sinh học, trong đó không chỉ bao gồm mạng lưới truyền tín hiệu hormone mà còn là sự phối hợp của nhiều con đường tín hiệu khác cùng với hệ thống điều hòa biểu hiện gene được hình thành và bảo tồn trong quá trình tiến hóa. Trong bối cảnh đó, các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2 được xem là những thành phần điều hòa trung tâm, tham gia kiểm soát phản ứng của thực vật trước các điều kiện bất lợi thông qua cả cơ chế phụ thuộc lẫn độc lập với hormone. Nhiều nghiên cứu gần đây đã làm rõ vai trò của họ nhân tố phiên mã này trong đáp ứng của thực vật đối với từng dạng stress riêng lẻ, bao gồm mặn, hạn cũng như các điều kiện nhiệt độ cực đoan. Tuy nhiên, so với các nghiên cứu về từng stress đơn lẻ, hiểu biết hiện tại về cơ chế phân tử điều phối phản ứng của AP2 trước tổ hợp nhiều yếu tố stress đồng thời vẫn còn hạn chế, đặc biệt là sự kết hợp giữa hạn và mặn - hai tác nhân thường xuyên xuất hiện song song trong điều kiện biến đổi khí hậu. Việc làm sáng tỏ vai trò và cơ chế hoạt động của họ nhân tố AP2 trong bối cảnh stress tổ hợp có ý nghĩa quan trọng, góp phần định hướng các chiến lược cải tiến di truyền nhằm duy trì sinh trưởng, phát triển và năng suất ổn định cho cây trồng nói chung và cây đậu tương nói riêng trong điều kiện môi trường bất lợi.

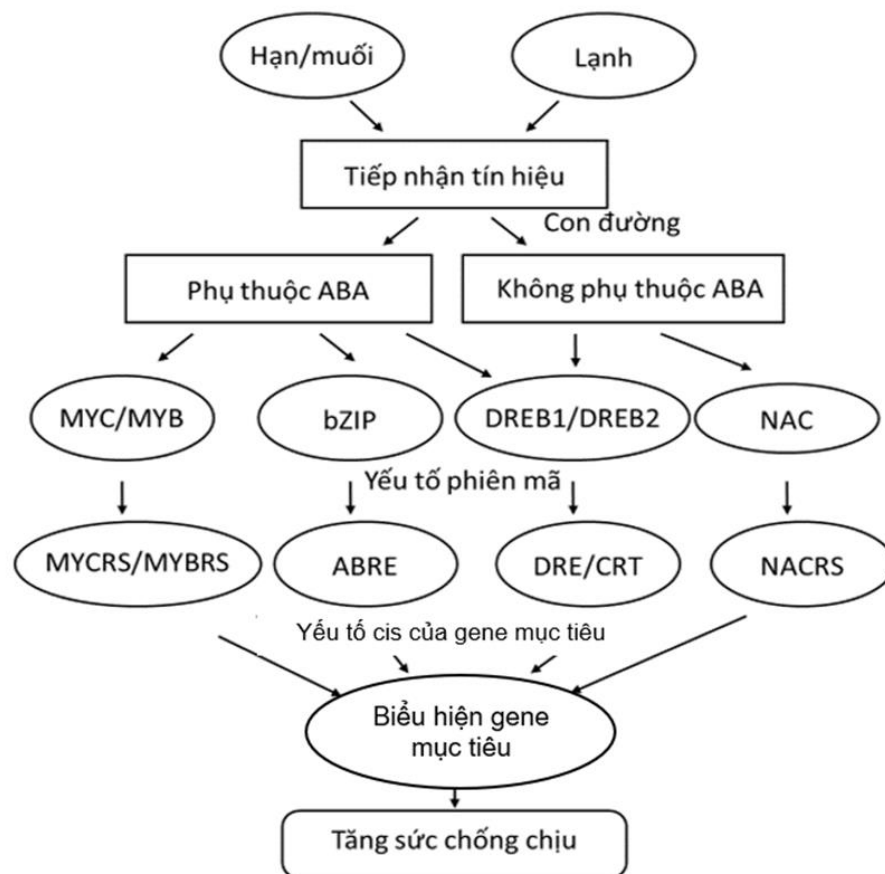
1.1.2. Phân họ DREB

1.1.2.1. Đặc điểm của phân họ DREB

Nhân tố phiên mã giữ vai trò then chốt trong việc điều hòa các quá trình sinh học thiết yếu ở thực vật, từ sinh trưởng, phát triển, trao đổi chất và sinh sản cho đến khả năng thích nghi với những biến động của môi trường. Trong số các nhân tố phiên mã đã được xác định, phân họ DREB là một nhóm lớn thuộc họ AP2, là một trong những nhóm được nghiên cứu nhiều nhất nhờ vai trò nổi bật trong điều hòa phản ứng của thực vật trước các dạng stress phi sinh học, đặc biệt là mặn, hạn và nhiệt độ.

Các thành viên thuộc phân họ DREB được đặc trưng bởi sự hiện diện của miền AP2/ERF có mức độ bảo tồn cao, với độ dài khoảng 58 - 59 amino acid, đóng vai trò quyết định trong khả năng nhận biết và liên kết với các trình tự *cis* đặc hiệu thuộc kiểu DRE/CRT nằm trong vùng khởi động của các gene mục tiêu. Thông qua sự tương tác này, nhân tố DREB có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế sự biểu hiện của các gene liên quan đến cơ chế bảo vệ và thích nghi với stress phi sinh học [132]. Trình tự lõi đặc trưng của yếu tố DRE (5'-TACCGACAT-3') lần đầu tiên được phát hiện trong vùng khởi động của gene *RD29A* ở *A. thaliana* và được chứng minh tham gia vào đáp ứng với stress thẩm thấu thông qua con đường tín hiệu không phụ thuộc ABA [115]. Ban đầu, các protein DREB được nhận diện dựa trên khả năng liên kết đặc hiệu với yếu tố DRE trong cả điều kiện stress và không stress. Các nghiên cứu tiếp theo đã khẳng định vai trò trung tâm của yếu tố *cis* DRE/CRT trong việc điều hòa mạng lưới biểu hiện gene đáp ứng với nhiều dạng stress phi sinh học, bao gồm hạn, mặn và lạnh, thông qua sự phối hợp của cả các con đường tín hiệu phụ thuộc và không phụ thuộc ABA [46].

Miền liên kết DNA của các protein thuộc phân họ DREB thể hiện mức độ bảo tồn cao ở nhiều loài thực vật khác nhau, bao gồm *A. thaliana*, lúa, đậu tương, đậu xanh, cà chua, thuốc lá và kê [32], [64]. Các nghiên cứu phân tích trình tự cho thấy, hai amino acid bảo tồn là valine tại vị trí 14 và glutamic tại vị trí 19 của miền AP2/ERF, giữ vai trò then chốt trong việc đảm bảo tính đặc hiệu của sự tương tác giữa protein DREB và trình tự *cis* DRE. Vùng đầu N của các protein DREB thường giàu amino acid mang điện tích dương và được dự đoán hoạt động như một tín hiệu định vị nhân giúp protein được vận chuyển vào nhân tế bào. Gần kề miền AP2/ERF, sự hiện diện của các vùng giàu serine và threonine được cho là liên quan đến các quá trình phosphoryl hóa, qua đó điều chỉnh hoạt tính sinh học của protein trong điều kiện stress [4], [64].



Hình 1.2. Sơ đồ biểu diễn sự tiếp nhận tín hiệu stress từ ngoại cảnh và biểu hiện gene thông qua con đường phụ thuộc và không phụ thuộc ABA [46].

Ngược lại, vùng đầu C của protein DREB thường giàu các amino acid mang điện tích âm và được cho là đóng vai trò như miền điều hòa phiên mã, có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế biểu hiện của các gene mục tiêu. Ở mức độ phân nhóm, các protein thuộc nhóm DREB1 được đặc trưng bởi sự hiện diện của một số motif bảo tồn đặc hiệu, bao gồm tín hiệu định vị nhân với trình tự “PKRPAGRTKFRETRHP”, mô đun DSAW nằm trong miền AP2/ERF và motif LWSY ở vùng C-terminal. Trong khi đó, các protein thuộc nhóm DREB2 (A-2) và DREB3/4 (A-3, A-4) mang các trình tự tín hiệu định vị nhân (NLS) khác nhau, thường nằm kế cận miền AP2/ERF, đồng thời thiếu các motif đặc trưng ở đầu C. Những khác biệt này phản ánh sự đa dạng về cấu trúc cũng như cơ chế điều hòa trong phân họ DREB [132].

1.1.2.2. Sự phát sinh chủng loại của phân họ DREB

Gene mã hóa yếu tố phiên mã DREB đóng vai trò trung tâm trong việc tiếp nhận tín hiệu stress và điều hòa mạng lưới biểu hiện gene. Các nghiên cứu phát sinh chủng loại dựa trên phân tích trình tự miền bảo tồn AP2/ERF cho thấy, mặc dù các gene *DREB* có mức độ bảo tồn cao giữa các loài nhưng vẫn thể hiện sự đa dạng đáng kể về cấu trúc và chức năng, phản ánh quá trình phân hóa thích nghi trong suốt lịch sử tiến hóa.

Phân tích phát sinh chủng loại trên 159 protein DREB, bao gồm 56 trình tự từ *A. thaliana* và 103 trình tự từ đậu tương, đã phân chia các thành viên của phân họ này thành sáu nhóm phụ riêng biệt, ký hiệu từ A-1 đến A-6 [44]. Mỗi nhóm thể hiện những đặc điểm cấu trúc và vai trò sinh học đặc thù trong đáp ứng với các điều kiện stress khác nhau. Cụ thể, các nhân tố thuộc nhóm A-1 (DREB1) chủ yếu tham gia điều hòa phản ứng của thực vật trước stress lạnh [41]; nhóm A-2 (DREB2) có mối liên hệ chặt chẽ với cơ chế đáp ứng hạn và mặn [23], [95]. Nhóm A-3 bao gồm những nhân tố điều hòa đặc biệt, điển hình là ABI4, chịu ảnh hưởng của tín hiệu ABA và glucose; trong khi nhóm A-4 (TINY) được ghi nhận có vai trò trong việc điều hòa sinh trưởng với đáp ứng stress [105]; Ngoài ra, các nhóm A-5 và A-6 được cho là tham gia vào phản ứng của thực vật trước nhiều dạng stress khác nhau, bao gồm hạn hán, mặn và nhiệt độ cao [59], [60].

Ở cây đậu tương, các nghiên cứu giai đoạn đầu cho rằng số lượng gene thuộc phân họ DREB tương đối ít [88]. Tuy nhiên, với sự phát triển của các cơ sở dữ liệu hệ gene, những phân tích dựa trên nguồn dữ liệu từ GenBank đã cung cấp cái nhìn toàn diện hơn. Theo đó, Nguyễn và cs (2021) cho thấy hệ gene đậu tương hiện được ghi nhận có tổng cộng 16 biến thể, tương ứng với bảy gene *DREB* khác nhau. Các gene này bao gồm *GmDREB* (với các biến thể *GmDREB*, *GmDREBa*), *GmDREB1* (gồm *GmDREB1*, *GmDREB1B*, *GmDREB1D*, *GmDREB1E*, *GmDREB1F*), *GmDREB2* (bao gồm *GmDREB2*, *GmDREB2A2*, *GmDREB2C-like*, *GmDREB2D*, *GmDREB2F*) cùng với các gene *GmDREB3*, *GmDREB5*, *GmDREB6* và *GmDREB7* [81]. Nhiều gene *DREB* ở đậu tương đã được phân lập, Chen và cs (2004) lần đầu phân lập thành công gene *DREB1* từ mRNA của cây đậu tương với chiều dài 705 bp [22]; kết quả này sau đó được Charlson và cs (2009) xác nhận khi phân lập gene

tương ứng từ DNA hệ gene [16]. Tiếp đó, Chen và cs (2007) đã phân lập gene *GmDREB5* từ mRNA với kích thước 927 bp [20] và trong nghiên cứu năm 2009, nhóm tác giả này tiếp tục xác định gene *GmDREB3* có chiều dài 597 bp từ mRNA [21]. Ngoài ra, gene *GmDREB6* cũng được phân lập từ mRNA với độ dài 693 bp [82]. Đáng chú ý, *GmDREB6* được xác định là gene có mức cảm ứng mạnh dưới điều kiện mặn và việc biểu hiện gene này ở cây chuyển gene cho thấy khả năng cải thiện rõ rệt tính chịu mặn, khẳng định tiềm năng ứng dụng của gene trong cải tiến giống cây trồng [82], [109].

Trong phân họ DREB, nhóm A-5 đã được ghi nhận sự hiện diện rộng rãi ở nhiều loài thực vật bậc cao và ở rêu, chiếm một tỷ lệ đáng kể trong tổng số gene *DREB*. Tuy nhiên, so với các nhóm A-1 và A-2, nhóm A-5 vẫn còn ít được khai thác về mặt chức năng. Ở *A. thaliana*, nhóm A-5 bao gồm 16 thành viên, song đến nay chỉ có chức năng của *AtRAP2.1* được nghiên cứu tương đối đầy đủ. Mặc dù gene *AtRAP2.1* được cảm ứng bởi hạn hán và nhiệt độ thấp thông qua con đường tín hiệu không phụ thuộc ABA, protein *AtRAP2.1* lại thể hiện vai trò điều hòa âm tính, làm giảm mức biểu hiện của các gene liên quan đến đáp ứng mất nước, từ đó dẫn đến sự suy giảm khả năng chịu stress của cây. Trái ngược với vai trò ức chế được ghi nhận ở *A. thaliana*, các nghiên cứu trên nhiều loài thực vật khác như bông, táo dại, khoai tây, dương và rêu sống trong điều kiện stress đã cho thấy nhiều thành viên thuộc nhóm A-5 khi được biểu hiện mạnh ở cây chuyển gene có khả năng cải thiện đáng kể tính chịu hạn, chịu mặn hoặc chịu stress thẩm thấu. Các cơ chế được đề xuất bao gồm tăng cường khả năng loại bỏ các dạng oxy hoạt tính (ROS), điều chỉnh cân bằng thẩm thấu và duy trì ổn định cấu trúc protein dưới điều kiện stress [59], [92].

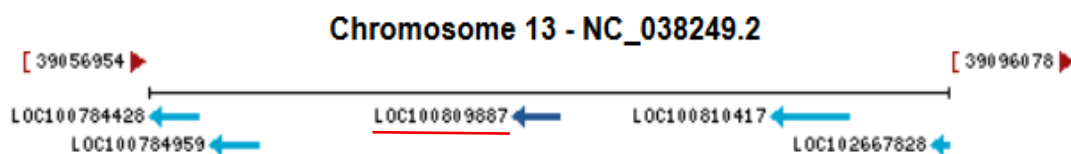
Mặc dù một số gene *DREB* thuộc họ AP2 đã được nhận diện và bước đầu mô tả ở đậu tương. Tuy nhiên, hiểu biết về chức năng sinh học cụ thể của phần lớn các gene này trong điều kiện stress phi sinh học vẫn còn rất hạn chế. Đáng chú ý, các gene *GmDREB5* và *GmDREB7* được dự đoán là những thành viên quan trọng thuộc nhóm A-5 của phân họ DREB. Cho đến nay, các nghiên cứu mới dừng lại ở việc xác định và phân tích trình tự của hai gene này, trong khi các bằng chứng thực

nghiệm liên quan đến chức năng sinh học của chúng vẫn chưa được làm rõ. Sự thiếu hụt này đặt ra câu hỏi khoa học trọng tâm về vai trò điều hòa của *GmDREB5* và *GmDREB7* trong đáp ứng chịu hạn và chịu mặn ở đậu tương, cũng như các cơ chế phân tử chi phối hoạt động của chúng. Do đó, việc triển khai các nghiên cứu chức năng thông qua các tiếp cận di truyền ngược và chuyển gene là cần thiết, không chỉ nhằm làm sáng tỏ vai trò sinh học của *GmDREB5* và *GmDREB7*, mà còn tạo nền tảng khoa học cho việc khai thác hiệu quả các gene *DREB* tiềm năng trong chương trình chọn tạo giống đậu tương có khả năng chịu mặn và chịu hạn cao.

1.1.2.3. Đặc điểm cấu trúc gene *GmDREB5* và *GmDREB7*

Gene *GmDREB5* của cây đậu tương đã được nhân dòng, giải trình tự và đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank với tổng cộng tám trình tự, bao gồm các mẫu giống thu thập tại Việt Nam và giống đối chứng Williams. Trong số đó, trình tự của giống Xanhtiendai đã được lựa chọn để phục vụ cho nghiên cứu, với mã số truy cập FR822737.1.

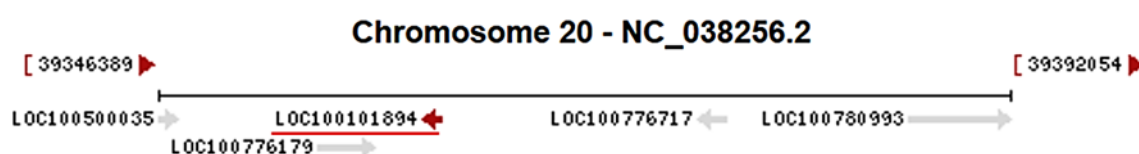
Gene *GmDREB5* (ID gene: 100809887) là một thành viên thuộc phân họ DREB trong họ nhân tố phiên mã AP2/ERF của hệ gene đậu tương, thuộc nhiễm sắc thể số 13 (Hình 1.3). Trình tự mRNA của gene này có chiều dài 924 bp, mã hóa protein gồm 307 amino acid. Protein *GmDREB5* đặc trưng bởi sự hiện diện của miền AP2 có độ dài 63 amino acid. Cấu trúc và vị trí của miền AP2 đã được phân tích chi tiết và trình bày trong các phụ lục (PL1, PL2A, PL2B).



Hình 1.3. Vị trí của gene *GmDREB5* (LOC100809887) trên nhiễm sắc thể số 13 [26].

Với vai trò là một nhân tố phiên mã, *GmDREB5* được dự đoán tham gia điều hòa biểu hiện của các gene mục tiêu liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học. Sự biểu hiện quá mức gene này có khả năng hoạt hóa các con đường sinh lý và phân tử, qua đó góp phần nâng cao khả năng thích nghi và chống chịu của cây đậu tương trước các điều kiện bất lợi như hạn hán và stress mặn.

Gene *GmDREB7* (Gene ID: 100101894) được xác định trong hệ gene đậu tương và nằm trên nhiễm sắc thể số 20 (Hình 1.4). Trên cơ sở dữ liệu GenBank, gene có hai phiên bản trình tự mRNA là NM_001248108.1 và NM_001248108.2. Trong đó, phiên bản NM_001248108.2 (cập nhật ngày 29/4/2021) được sử dụng cho nghiên cứu, có chiều dài 879 bp, bao gồm vùng mã hóa dài 624 bp (PL3).



Hình 1.4. Vị trí của gene *GmDREB7* (LOC100101894) trên nhiễm sắc thể số 20 [79].

Protein suy diễn từ gene *GmDREB7* có chiều dài 207 amino acid, thuộc họ nhân tố phiên mã DREB trong họ AP2/ERF. Phân tích cấu trúc cho thấy protein này chứa một miền AP2 bảo thủ gồm 59 amino acid, đặc trưng cho khả năng nhận biết và liên kết với các trình tự *cis* trên promoter của các gene mục tiêu (PL4). Trong miền AP2, có 11 vị trí amino acid tham gia trực tiếp vào tương tác với DNA (PL5), cho thấy vai trò tiềm năng của *GmDREB7* trong điều hòa phiên mã các gene liên quan đến đáp ứng stress. Trong hệ gene đậu tương, *GmDREB7* được xem là một gene mới được nghiên cứu, với chức năng sinh học chưa được mô tả đầy đủ. Vai trò của gene này đã nghiên cứu bước đầu thông qua chuyển gene gián tiếp bằng *A. tumefaciens* kết hợp với phân tích mức độ biểu hiện gene ở các dòng thuốc lá chuyển gene, từ đó cung cấp bằng chứng về chức năng điều hòa đáp ứng stress của *GmDREB7*.

1.1.3. Nhận xét

Nhân tố phiên mã đóng vai trò then chốt trong việc kiểm soát và điều hòa 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 mục tiêu, 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 AP2 liên kết với DNA 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. Tuy nhiên, sự khác biệt đáng kể về cấu trúc protein cũng như chức năng sinh học giữa các nhóm DREB cho thấy cơ chế điều hòa của phân họ này mang tính phức tạp và phụ thuộc vào bối cảnh sinh lý cũng như loài thực vật.

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 mặn, chịu hạn, 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 ĐẬU TƯƠNG Ở CÂY MÔ HÌNH

1.2.1. Nghiên cứu chức năng gene đậu tương ở cây mô hình thuốc lá

Trong nghiên cứu sinh học phân tử thực vật, các loài cây mô hình như *A. thaliana* và cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) được sử dụng rộng rãi để phân tích chức năng gene nhờ đặc điểm sinh trưởng thuận lợi và khả năng biến nạp hiệu quả. *A. thaliana* có kích thước hệ gene nhỏ, đã được giải trình tự hoàn chỉnh, vòng đời ngắn và nguồn tài nguyên di truyền phong phú, do đó thích hợp cho các nghiên cứu

di truyền và điều hòa biểu hiện gene [51]. Tuy nhiên, do không phải cây trồng kinh tế, kết quả nghiên cứu trên *A. thaliana* thường cần được kiểm chứng thêm trên các đối tượng cây trồng khác trước khi ứng dụng thực tiễn.

Trong số các hệ thống mô hình thực vật, cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) được xem là đối tượng phù hợp cho nghiên cứu chức năng gene ở cây trồng nhờ nhiều ưu điểm nổi bật. Cây thuốc lá có khả năng tái sinh mạnh, sinh trưởng nhanh, sinh khối lớn và thích nghi tốt với nhiều điều kiện sinh thái [62]. Đặc biệt, hệ thống chuyển gene thông qua *A. tumefaciens* ở cây thuốc lá đã được thiết lập ổn định với hiệu quả biến nạp cao, giúp rút ngắn thời gian tạo dòng chuyển gene và nâng cao tính ổn định di truyền qua nhiều thế hệ [10], [74]. Ngoài ra, kích thước lá lớn tạo thuận lợi cho các phân tích sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử. Nhờ những ưu thế này, cây thuốc lá được sử dụng rộng rãi như một hệ thống mô hình trung gian để đánh giá chức năng gene trước khi triển khai nghiên cứu trên cây mục tiêu.

Trong bối cảnh biến đổi khí hậu làm gia tăng các điều kiện bất lợi như hạn hán, mặn và nhiệt độ cực đoan, nhiều nghiên cứu đã sử dụng cây thuốc lá chuyển gene để đánh giá vai trò của các gene đầu tương liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học. Các gene thuộc họ nhân tố phiên mã AP2/ERF, đặc biệt là phân họ DREB, được quan tâm do tham gia điều hòa biểu hiện của nhiều gene đáp ứng stress. Nghiên cứu của Dao và cs cho thấy các dòng thuốc lá biểu hiện gene *GmDREB2* tích lũy proline cao hơn cây đối chứng dưới điều kiện hạn, chứng minh vai trò tích cực của gene này trong cơ chế chịu hạn [28]. Tương tự, Tu và cs ghi nhận việc biểu hiện quá mức *GmDREB6* làm tăng mức phiên mã của các gene liên quan đến điều hòa thẩm thấu và vận chuyển ion như *NtP5CS* và *NtCLC* dưới điều kiện mặn, qua đó góp phần cải thiện khả năng chịu mặn của cây chuyển gene [109]. Trong khi đó, nghiên cứu của Nguyen và cs cho thấy *GmDREB7* có thể tham gia điều hòa âm mạng lưới đáp ứng stress mặn thông qua việc làm giảm biểu hiện của các gene *NtRD29A* và *NtSODFe* [83].

Bên cạnh nhóm DREB, một số nhân tố phiên mã khác thuộc họ AP2/ERF cũng được chứng minh có vai trò quan trọng trong đáp ứng stress. Gene *GmERF3* khi biểu hiện trên cây thuốc lá không chỉ làm tăng khả năng chống chịu hạn thông

qua tích lũy proline và carbohydrate hòa tan mà còn nâng cao tính kháng đối với một số tác nhân gây bệnh và virus [124]. Ngoài các gene điều hòa, một số gene cấu trúc cũng được nghiên cứu trên hệ thống cây thuốc lá chuyển gene. Gene *GmEXP1*, mã hóa protein expansin liên quan đến giãn nở thành tế bào, được ghi nhận giúp tăng chiều dài và thể tích rễ ở cây thuốc lá chuyển gene, từ đó cải thiện khả năng thích nghi với điều kiện thiếu nước [67].

Nhìn chung, cây thuốc lá là hệ thống mô hình hiệu quả trong nghiên cứu chức năng gene đậu tương nhờ khả năng chuyển gene ổn định, thời gian tạo dòng ngắn và thuận lợi cho các phân tích sinh lý - phân tử. Việc sử dụng cây thuốc lá làm hệ thống đánh giá trung gian giúp sàng lọc nhanh các gene tiềm năng liên quan đến khả năng chống chịu stress, tạo cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng và cải tiến giống cây trồng trong điều kiện biến đổi khí hậu.

1.2.2. Nhận xét

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 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 chức năng và xác định có vai trò quan trọng trong cơ chế đáp ứng với stress phi sinh học. Đặc biệt, các gene mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF, bao gồm phân họ DREB, được xem là những yếu tố điều hòa chủ chốt trong mạng lưới đáp ứng stress do có khả năng kiểm soát biểu hiện của nhiều gene mục tiêu liên quan đến điều hòa áp suất thẩm thấu, duy trì cân bằng ion và bảo vệ tế bào trước các điều kiện môi trường bất lợi.

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 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 phân 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 phân họ DREB ở đậu tương vẫn còn hạn chế. Nhiều thành viên trong phân 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 nhằm làm sáng tỏ vai trò của gene này trong cơ chế điều hòa đáp ứng stress, đồng thời bổ sung thêm bằng chứng khoa học cho việc khai thác các gene *DREB* trong cải thiện khả năng thích nghi của cây trồng trước các điều kiện môi trường bất lợi.

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

1.3.1. Cây đậu tương và đặc tính chịu hạn, mặn ở cây đậu tương

1.3.1.1. Đặc điểm sinh học, nguồn gốc, giá trị kinh tế và dinh dưỡng ở cây đậu tương

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill, $2n = 40$), là cây thân thảo hai lá mầm thuộc họ Đậu (*Fabaceae*), chi *Glycine*, được trồng phổ biến trên thế giới với mục đích thu hạt. Hệ rễ dạng rễ cọc phát triển mạnh, mang nhiều rễ bên và hình thành nốt sần cộng sinh với vi khuẩn cố định đạm. Cơ chế cố định nitơ sinh học không chỉ đáp ứng một phần nhu cầu dinh dưỡng của cây mà còn góp phần cải thiện độ phì nhiêu của đất, làm tăng giá trị của đậu tương trong hệ thống luân canh. Thân cây hình trụ, thường có 8 - 14 đốt, có thể phân cành tùy thuộc kiểu hình giống và điều kiện sinh trưởng. Lá kép với ba lá chét là dạng phổ biến, đóng vai trò quan trọng trong quang hợp và điều hòa sinh trưởng. Đậu tương là loài thực vật tự thụ phấn, hoa nhỏ, lưỡng tính, thường có màu trắng hoặc tím. Quả thuộc loại quả rộp,

chứa hạt có hình dạng và màu sắc đa dạng, phản ánh đặc điểm di truyền phong phú của loài [36].

Về nguồn gốc, đậu tương được cho là có nguồn gốc từ khu vực Đông Á và được thuần hóa từ loài đậu tương hoang dại *Glycine soja* tại Trung Quốc khoảng 1100 năm trước Công nguyên. Sau đó, cây đậu tương được đưa vào trồng tại nhiều quốc gia trong khu vực châu Á như Miến Điện, Ấn Độ, Indonesia, Hàn Quốc, Nhật Bản, Malaysia, Nepal, Philippines, Thái Lan và Việt Nam, từ khoảng thế kỷ XVI sau Công nguyên. Ở châu Âu, đậu tương lần đầu tiên được ghi nhận vào năm 1737 trong tác phẩm "Hortus Cliffortianus" của nhà thực vật học Linnaeus; sau đó được trồng thử nghiệm tại Pháp (1739) chủ yếu với mục đích làm cảnh, vào năm 1790 ở Anh. Đến năm 1804, đậu tương được trồng tại Nam Tư như một nguồn thức ăn cho gia súc. Tại Hoa Kỳ, đậu tương được ghi nhận xuất hiện lần đầu vào năm 1765 tại Bang Georgia. Một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử phát triển cây đậu tương xảy ra vào năm 1917, khi bột đậu tương được xác định là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng cho chăn nuôi, qua đó thúc đẩy mạnh mẽ ngành công nghiệp chế biến đậu tương. Nhờ những tiến bộ trong chọn giống, canh tác và công nghiệp hóa nông nghiệp, đến năm 1970, Hoa Kỳ đã vươn lên trở thành quốc gia sản xuất đậu tương lớn nhất thế giới, chiếm khoảng 2/3 sản lượng toàn cầu [40].

Đậu tương là một trong những cây trồng có giá trị kinh tế và dinh dưỡng hàng đầu trên thế giới, được khai thác rộng rãi trong chế biến thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi và nhiều lĩnh vực công nghiệp khác. Hạt đậu tương có thành phần dinh dưỡng phong phú, với khoảng 18% lipid, 38% protein và gần 30% carbohydrate (trong đó tỷ lệ dạng hòa tan và không hòa tan tương đối cân bằng). Ngoài ra, hạt còn chứa khoảng 14% tro, cùng nhiều vitamin và khoáng chất thiết yếu cần thiết. Xét về chất lượng protein, đậu tương được đánh giá cao nhờ thành phần amino acid tương đối đầy đủ và cân bằng, bao gồm hầu hết các amino acid thiết yếu như tryptophan (1%), tyrosine (4%), valine (4%), arginine (8%), alanine (4%), aspartic acid (7%), cysteine (3%), glutamic acid (19%), glycine (4%), histidine (3%), phenylalanine (6%), isoleucine (5%), lysine (8%), leucine (8%), methionine (1%), proline (5%), serine (5%) và threonine (4%) [36]. Bên cạnh giá trị protein, đậu

tương còn là nguồn cung cấp dồi dào chất xơ, phytoestrogen và các hợp chất hoạt tính sinh học, đồng thời không chứa cholesterol tự do và lactose. Hạt đậu tương cũng giàu acid béo không no, đặc biệt omega-3, cùng các chất chống oxy hóa tự nhiên. Trong những năm gần đây, đậu tương được quan tâm như một nguồn thực phẩm có giá trị dinh dưỡng và chức năng sinh học cao. Hạt đậu tương chứa nhiều nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học (phytochemical) như hợp chất phenolic, flavonoid, lignan, carotenoid, coumarin, phytic acid, triterpen, các chất ức chế protease, oligosaccharide và chất xơ. Các hợp chất này được ghi nhận có vai trò tích cực đối với sức khỏe, bao gồm hỗ trợ giảm cholesterol máu, điều hòa chuyển hóa lipid, tăng cường khả năng chống oxy hóa và góp phần phòng ngừa một số bệnh mãn tính như tim mạch, rối loạn chuyển hóa và loãng xương. Bên cạnh giá trị dinh dưỡng, đậu tương còn có ý nghĩa kinh tế quan trọng do được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và dược phẩm, góp phần nâng cao giá trị sản xuất nông nghiệp [53].

Đậu tương được xem là một trong những cây trồng có vai trò quan trọng trong nền nông nghiệp toàn cầu, đặc biệt với tư cách là nguồn cung cấp dầu thực vật và protein. Trên phạm vi thế giới, xét về quy mô canh tác, đậu tương đứng thứ tư sau lúa mì, lúa gạo và ngô, đồng thời là loại cây trồng có diện tích lớn nhất trong nhóm cây họ đậu. Theo số liệu năm 2020, tổng diện tích gieo trồng đậu tương trên toàn thế giới đạt khoảng 127 triệu ha, với sản lượng ước tính 353,5 triệu tấn. Ba quốc gia gồm Brazil, Hoa Kỳ và Argentina hiện là những trung tâm sản xuất đậu tương lớn nhất thế giới, đóng góp khoảng 82% tổng sản lượng đậu tương toàn cầu [98].

Tại Việt Nam, đậu tương là cây trồng truyền thống, đã được canh tác từ lâu và phân bố tại nhiều vùng sinh thái khác nhau trên cả nước. Diện tích trồng đậu tương phân bố không đồng đều, trong đó, khu vực phía Bắc chiếm khoảng 65% tổng diện tích, còn khu vực phía Nam chiếm khoảng 35%. Một số địa phương có diện tích gieo trồng lớn bao gồm Hà Giang, Hà Nội và Thanh Hóa. Mặc dù vậy, sản xuất đậu tương trong nước hiện vẫn gặp nhiều hạn chế về diện tích, năng suất và hiệu quả canh tác, dẫn đến sản lượng thấp và chưa đáp ứng được nhu cầu tiêu dùng nội địa. Do đó, Việt Nam vẫn phải phụ thuộc lớn vào nguồn đậu tương nhập

khẩu. Theo số liệu của Tổng cục Thống kê năm 2023, diện tích gieo trồng đậu tương của Việt Nam đạt khoảng 30,1 nghìn ha, giảm 2,3 nghìn ha so với năm 2022, với sản lượng ước đạt 48,3 nghìn tấn [71].

1.3.1.2. Tác động của hạn và mặn đến sinh trưởng, phát triển ở đậu tương

Đậu tương là cây được gieo trồng rộng rãi tại các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới, với nhu cầu nước tương đối cao trong suốt chu kỳ trình sinh trưởng và phát triển. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu toàn cầu, sự gia tăng nhiệt độ trung bình cùng với biến động ngày càng khó dự báo của chế độ mưa đang đặt ra những thách thức lớn đối với sản xuất đậu tương, đặc biệt tại các vùng canh tác phụ thuộc vào nước mưa và có hạ tầng tưới tiêu hạn chế. Trong số các yếu tố stress phi sinh học, hạn hán và mặn được xác định là hai tác nhân gây tác động bất lợi nghiêm trọng nhất, làm suy giảm đáng kể sinh trưởng, năng suất và chất lượng hạt đậu tương.

Stress hạn có thể gây tổn thất năng suất đậu tương ở mức rất nghiêm trọng, trong một số điều kiện khắc nghiệt, mức giảm năng suất có thể vượt quá 50% [102]. Thiếu nước kéo dài làm rối loạn trạng thái cân bằng nội tại của cây, thể hiện qua sự suy giảm thế năng nước, sức căng tế bào, hàm lượng nước tương đối và sinh khối rễ tươi [9]. Các giai đoạn nảy mầm, ra hoa và hình thành quả được xem là nhạy cảm nhất với stress hạn [40]. Thiếu nước ở giai đoạn đầu sinh trưởng không chỉ làm giảm tỷ lệ nảy mầm mà còn ức chế sinh trưởng của cây con thông qua sự suy giảm hàm lượng diệp lục và carotenoid, đồng thời làm ngắn chiều dài chồi và rễ. Trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, stress hạn dẫn đến giảm chiều cao cây, số đốt và làm thay đổi vị trí đậu quả đầu tiên [102]. Ở giai đoạn sinh sản, hạn ảnh hưởng tiêu cực đến phân bố sinh khối, gây giảm trọng lượng hạt và năng suất, đồng thời làm suy giảm khả năng cố định đạm do ức chế hoạt động của enzyme nitrogenase [31]. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng stress hạn gây rối loạn trao đổi chất tế bào, làm tăng tính thấm màng, suy giảm hiệu suất quang hợp và ức chế biểu hiện của các gene tham gia vào sinh tổng hợp lipid, protein và carbohydrate [76].

Tương tự, stress mặn cũng được xem là một trong những yếu tố phi sinh học có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và phát triển của đậu tương, trong đó giai đoạn nảy mầm là thời kỳ nhạy cảm nhất [61]. Nồng độ muối cao (≥ 100 mM NaCl) làm

giảm đáng kể tỷ lệ nảy mầm, chiều dài chồi và rễ, đồng thời làm gia tăng tỷ lệ cây chết [133]. Ở giai đoạn cây con, stress mặn ức chế sinh trưởng thông qua việc giảm chiều dài lá, sinh khối và sự hình thành nốt sần [34]. Cây đậu tương chịu mặn thường biểu hiện các triệu chứng hình thái điển hình như héo, vàng lá, giảm chiều cao cây và trọng lượng khô của thân và rễ. Sự tích lũy quá mức các ion Na^+ và Cl^- trong mô lá gây mất cân bằng ion nội bào, làm gián đoạn các quá trình trao đổi chất và quang hợp, từ đó dẫn đến suy giảm năng suất và chất lượng hạt [110]. Ngoài ra, stress mặn gây stress thẩm thấu và stress oxy hóa, thể hiện qua sự gia tăng các dạng oxy phản ứng và MDA, gây tổn thương màng tế bào, làm giảm hàm lượng sắc tố quang hợp [29]. Hàm lượng các nguyên tố dinh dưỡng thiết yếu như N, P, K cũng bị suy giảm đáng kể dưới điều kiện mặn, đi kèm với sự rối loạn cân bằng hormone sinh trưởng (GA/ABA), góp phần làm ức chế sinh trưởng và năng suất của cây. Trong một nghiên cứu trên hơn 20 giống đậu tương cho thấy, khi độ dẫn điện của đất tăng từ 2 lên 7 dS/m, năng suất trung bình giảm khoảng 40%; đồng thời các giống mẫn cảm với mặn có thể chịu mức suy giảm năng suất cao hơn đến 37% so với các giống có khả năng chịu mặn trong cùng điều kiện. Đáng chú ý, ở giống đậu tương “Williams”, stress mặn còn làm suy giảm đáng kể chất lượng hạt, với hàm lượng protein và dầu giảm tới 39% [34].

Các kết quả nghiên cứu cho thấy, stress mặn và hạn tác động bất lợi đến cây đậu tương ở nhiều cấp độ, từ hình thái, sinh trưởng, sinh lý, trao đổi chất đến biểu hiện gene, dẫn đến suy giảm nghiêm trọng năng suất và chất lượng hạt. Do đó, việc làm sáng tỏ cơ chế phân tử điều hòa đáp ứng của đậu tương đối với stress hạn và mặn, đặc biệt thông qua các gene điều hòa như các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2, có ý nghĩa then chốt trong định hướng chọn tạo và phát triển các giống đậu tương có khả năng thích nghi tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi.

1.3.1.3. Cơ chế chịu hạn và chịu mặn ở cây đậu tương

Khi chịu tác động của các yếu tố bất lợi từ môi trường, điển hình là stress mặn và hạn, cây đậu tương đã hình thành trong quá trình tiến hóa một mạng lưới đáp ứng

thích nghi phức tạp, bao gồm các điều chỉnh ở nhiều cấp độ như hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tử. Các cơ chế này hoạt động phối hợp nhằm duy trì cân bằng nước và ion, hạn chế tổn thương do stress oxy hóa, điều hòa tín hiệu hormone và biểu hiện gene, từ đó bảo đảm sự sống sót và duy trì khả năng sinh trưởng của cây trong điều kiện stress kéo dài.

Ở cấp độ hình thái và sinh lý, stress hạn và mặn thường gây mất cân bằng thẩm thấu và làm suy giảm thể nước tế bào. Để hạn chế sự thất thoát nước, đậu tương có xu hướng đóng khí khổng, tăng cường tích lũy sáp biểu bì, phát triển lông che phủ, đồng thời điều chỉnh cấu trúc hệ rễ theo hướng tăng tỷ lệ rễ/thân, qua đó mở rộng vùng khai thác nước trong đất và nâng cao hiệu quả hấp thu nước [112]. Song song với các điều chỉnh hình thái, cây đậu tương còn tăng cường tích lũy các chất điều hòa thẩm thấu bao gồm proline, glycine betaine, polyamine và các loại đường hòa tan (glucose, sucrose, trehalose). Các hợp chất này góp phần ổn định áp suất thẩm thấu nội bào, bảo vệ cấu trúc protein và màng tế bào, cũng như duy trì hoạt động enzyme trong điều kiện stress [13], [31], [112].

Các hormone thực vật giữ vai trò trung tâm trong việc tích hợp và điều phối các phản ứng thích nghi với stress. Dưới tác động của hạn và mặn, cây đậu tương thường tăng cường sinh tổng hợp ABA, đồng thời điều chỉnh hàm lượng jasmonic acid (JA) và salicylic acid (SA), trong khi làm giảm nồng độ auxin (IAA) và gibberellin (GA). Những thay đổi này không chỉ ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và phát triển của cây mà còn tác động sâu sắc đến các con đường tín hiệu điều hòa biểu hiện gene liên quan đến khả năng chống chịu stress. Nhiều bằng chứng cho thấy ABA và JA có thể kích hoạt các gene mã hóa enzyme chống oxy hóa cũng như các protein bảo vệ tế bào, qua đó góp phần duy trì hoạt động quang hợp và cân bằng nước của cây dưới điều kiện mặn [97].

Ở mức độ phân tử, cây đậu tương huy động đồng thời nhiều nhóm gene chức năng và gene điều hòa nhằm tăng cường khả năng thích nghi trước các điều kiện stress bất lợi. Nhóm gene chức năng bao gồm các gene liên quan đến điều chỉnh áp suất thẩm thấu, chẳng hạn như các gene mã hóa protein bảo vệ tế bào như LEA, aquaporin và lipid transfer protein (LTP), cũng như các gene vận chuyển ion tham

gia duy trì cân bằng Na^+/K^+ , điển hình là *GmSALT3* và *GmCHX1*. Bên cạnh các gene chức năng, các nhân tố phiên mã giữ vai trò điều phối trung tâm trong việc kiểm soát mạng lưới biểu hiện gene đáp ứng stress. Nhiều nhân tố phiên mã thuộc các họ MYB, NAC và AP2/ERF đã được chứng minh có liên quan trực tiếp đến việc điều hòa các con đường tín hiệu liên quan đến cân bằng oxy hóa - khử, tín hiệu hormone và sự phát triển của hệ rễ ở đậu tương [125]. Thông qua khả năng điều chỉnh đồng thời nhiều gene mục tiêu, các nhân tố phiên mã này góp phần tạo nên tính linh hoạt và hiệu quả của hệ thống đáp ứng stress.

Việc làm sáng tỏ vai trò của các nhân tố phiên mã, đặc biệt là các protein thuộc họ AP2, trong điều hòa các con đường sinh lý và phân tử nêu trên có ý nghĩa khoa học và thực tiễn sâu sắc. Những hiểu biết này không chỉ góp phần hoàn thiện cơ sở lý luận về cơ chế chống chịu stress ở thực vật, mà còn tạo nền tảng cho việc phát triển các giống đậu tương chuyển gene có khả năng chịu hạn và chịu mặn cao hơn, đáp ứng yêu cầu sản xuất nông nghiệp bền vững trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay.

1.3.1.4. Đặc điểm của gene mã hoá enzyme P5CS và SODFe

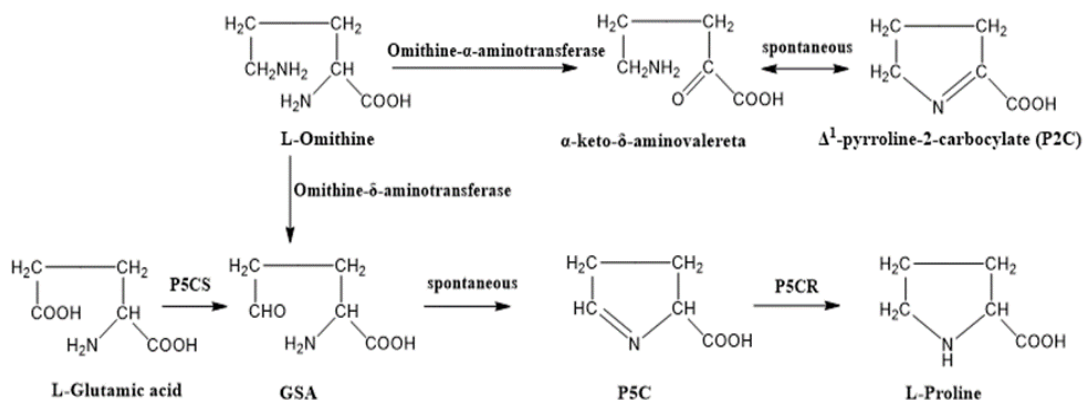
Một trong những cơ chế thích nghi quan trọng của thực vật trước các điều kiện bất lợi của môi trường là khả năng tích lũy các chất hữu cơ hòa tan trong tế bào. Các hợp chất này góp phần bảo vệ cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm điều chỉnh áp suất thẩm thấu, trung hòa các sản phẩm oxy hóa độc hại, ổn định màng cũng như duy trì cấu trúc và hoạt tính của protein, enzyme. Điều chỉnh thẩm thấu giữ vai trò then chốt trong việc duy trì cân bằng nước nội bào khi thực vật chịu tác động của stress hạn và mặn, thông qua sự tích lũy có chọn lọc các phân tử và ion như đường hòa tan, proline, glycine betaine, acid hữu cơ và các ion khoáng (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) [110].

Trong số các chất tham gia điều hòa áp suất thẩm thấu, proline được đánh giá là hợp chất giữ vai trò đặc biệt quan trọng. Sự tích lũy proline tự do là phản ứng phổ biến của nhiều nhóm sinh vật, bao gồm thực vật bậc cao, tảo, vi khuẩn và động vật, khi tiềm năng nước của môi trường giảm. Ở thực vật, hàm lượng proline gia tăng giúp tế bào duy trì áp suất thẩm thấu, bảo toàn trạng thái ngậm

nước và bảo vệ các cấu trúc dưới tế bào trước những tổn thương do stress gây ra. Bên cạnh vai trò điều hòa thẩm thấu, proline được ghi nhận có tác dụng tăng cường hoạt động của hệ thống enzyme chống oxy hóa, qua đó góp phần kiểm soát sự gia tăng ROS trong điều kiện stress. Đồng thời, proline hoạt động như một chaperone phân tử, góp phần ổn định cấu trúc không gian ba chiều của protein và duy trì chức năng sinh học của enzyme [113].

Ở thực vật, proline được tổng hợp chủ yếu thông qua hai con đường sinh hóa là con đường glutamate (Glu) và con đường ornithine (Orn), trong đó con đường Glu giữ vai trò chi phối dưới điều kiện stress thẩm thấu. Trong con đường này (Hình 1.5), glutamate được enzyme pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) xúc tác chuyển hóa thành glutamate-semialdehyde (GSA), sau đó tự chuyển hóa thành pyrroline-5-carboxylate (P5C). P5C tiếp tục được khử thành proline nhờ enzyme pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR). Trong con đường Orn, ornithine được chuyển hóa thành GSA và P5C thông qua enzyme ornithine- δ -aminotransferase (OAT), sau đó P5CR xúc tác tạo thành proline. Ngược lại, quá trình dị hóa proline diễn ra trong ty thể, nơi proline bị oxy hóa trở lại thành glutamate thông qua hoạt động của proline dehydrogenase (PDH) và P5C dehydrogenase (P5CDH) [30].

Là enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp proline, gene *P5CS* đóng vai trò trung tâm trong điều hòa hàm lượng proline nội bào. Gene *P5CS* lần đầu tiên được phân lập từ cây họ đậu vào năm 1992. Kể từ đó, nhiều gene *P5CS* ở các loài thực vật khác nhau đã được xác định và nghiên cứu chức năng, đặc biệt liên quan đến khả năng thích nghi với stress phi sinh học. Ở nhiều loài thực vật, *P5CS* thường được mã hóa bởi hai gene tương đồng, chẳng hạn như *AtP5CS1* và *AtP5CS2* ở *A. thaliana* hoặc *OsP5CS1* và *OsP5CS2* ở lúa. Ở *A. thaliana*, hai gene *AtP5CS1* và *AtP5CS2* được điều hòa khác biệt về không gian và điều kiện sinh lý; trong đó *AtP5CS1* chủ yếu được cảm ứng bởi hạn hán, mặn và hormone ABA, còn *AtP5CS2* liên quan nhiều hơn đến sinh trưởng và phát triển bình thường của cây. Phân tích promoter của gene *P5CS* cho thấy hoạt động phiên mã của gene này được kích hoạt mạnh dưới tác động của stress NaCl, phản ánh vai trò điều hòa trực tiếp của *P5CS* trong đáp ứng mặn [118].



Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp proline ở thực vật bậc cao [30].

Các nghiên cứu chuyển gene cũng đã cung cấp bằng chứng thuyết phục về vai trò của *P5CS* trong tăng cường khả năng chống chịu stress. Việc biểu hiện quá mức *P5CS* ở *A. thaliana* dẫn đến sự gia tăng đáng kể hàm lượng proline và cải thiện khả năng chịu stress thẩm thấu so với cây đối chứng. Ở lúa, *OsP5CS1* được cảm ứng bởi nhiều loại stress phi sinh học như mặn, hạn và nhiệt độ thấp, trong khi *OsP5CS2* biểu hiện mạnh ở giai đoạn cây trưởng thành và phản ứng rõ rệt với NaCl và mannitol. Gene *LhSorP5CS* ở hoa loa kèn lai phương Đông được kích hoạt bởi NaCl, mannitol và ABA, đi kèm với sự tích lũy proline tăng cao. Ở đậu cô ve, sự biểu hiện quá mức *PvP5CS1* và *PvP5CS2* trong *A. thaliana* làm tăng khả năng chịu mặn, trong đó *PvP5CS2* cho hiệu quả tổng hợp proline cao hơn dưới điều kiện stress mặn [118], [122]. Những kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở thuốc lá và lúa mì, khẳng định vai trò của gene *P5CS* trong cơ chế chống chịu hạn và mặn thông qua điều hòa sinh tổng hợp proline.

Các yếu tố bất lợi của môi trường như hạn hán, mặn, nhiệt độ thấp và nhiễm độc kim loại gây rối loạn cân bằng sinh lý, làm suy giảm sinh trưởng và năng suất cây trồng. Dưới tác động của các stress phi sinh học này, thực vật thường gia tăng sản sinh các dạng oxy phản ứng như anion superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) và gốc hydroxyl (OH), dẫn đến stress oxy hóa và tổn thương màng, protein cũng như vật chất di truyền. Để hạn chế tác hại của ROS, thực vật đã hình thành một hệ thống phòng vệ chống oxy hóa hiệu quả, bao gồm cả các hợp chất không enzyme và

enzyme, trong đó nhóm enzyme superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) và ascorbate peroxidase (APX) giữ vai trò trung tâm [125].

SOD được xem là tuyến phòng vệ đầu tiên chống lại stress oxy hóa do khả năng xúc tác phản ứng phân hủy anion superoxide thành oxy phân tử và hydrogen peroxide. Enzyme này phân bố ở nhiều cơ quan thực vật như rễ, lá, quả và hạt, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao khả năng thích nghi của cây trước các điều kiện môi trường bất lợi. Dựa trên ion kim loại tại trung tâm hoạt động, SOD ở thực vật được chia thành ba nhóm chính gồm SODCu/Zn (CSD), SODFe (FSD) và SODMn (MSD), mỗi nhóm có đặc điểm cấu trúc, vị trí nội bào và chức năng sinh lý khác nhau [91].

Ở thực vật mô hình *A. thaliana*, các gene mã hóa SOD tạo thành một họ đa gene, bao gồm ba gene *CSD* (*CSD1-CSD3*), ba gene *FSD* (*FSD1-FSD3*) và hai gene *MSD* (*MSD1-MSD2*). Các gene này mã hóa các dạng protein SOD có sự định vị đặc hiệu trong tế bào. Cụ thể, protein CSD được ghi nhận hiện diện ở tế bào chất, lục lạp, peroxisome và thành tế bào; protein FSD chủ yếu phân bố trong lục lạp; trong khi protein MSD tập trung chủ yếu ở ty thể và một phần ở peroxisome. Sự phân bố đặc hiệu này phản ánh chức năng chuyên biệt của từng dạng protein SOD trong việc điều hòa các loại oxy phản ứng (ROS) tại các bào quan khác nhau. Về mặt cấu trúc protein, SOD là enzyme có cấu trúc bậc hai gồm các vùng xoắn α và phiến gấp β . SODCu/Zn chủ yếu giàu phiến gấp β , trong khi SODFe và SODMn có cấu trúc hỗn hợp giữa xoắn α và phiến gấp β . Phân tích trình tự và mối quan hệ tiến hóa cho thấy SODFe và SODMn có mức độ tương đồng cao, gợi ý nguồn gốc tiến hóa chung, trong khi SODCu/Zn tách biệt rõ rệt. Ở trạng thái tự nhiên, SODFe thường tồn tại dưới dạng hai hoặc bốn tiểu đơn vị liên kết với nhau, trong đó mỗi tiểu đơn vị có khối lượng khoảng 20 kDa. Trung tâm hoạt động của SODFe được cố định bởi các amino acid bảo thủ, chủ yếu là histidine và aspartate, tạo thành phối tử bốn càng liên kết chặt chẽ với ion Fe, đảm bảo tính ổn định và hoạt tính xúc tác của enzyme [120].

Các nghiên cứu hệ gene đã xác định số lượng và sự phân bố gene *SOD* khác nhau giữa các loài thực vật. Ví dụ, ở lúa có 8 gene *SOD*, *A. thaliana* có 9 gene, cây

trà có 10 gene và nho có 13 gene *SOD*. Riêng *SODFe* đã được phân lập và đặc trưng ở nhiều loài như thuốc lá, đậu tương, cho thấy vai trò bảo tồn của nhóm gene này trong đáp ứng stress phi sinh học. Ngược lại, đến nay vẫn chưa có bằng chứng xác thực về sự tồn tại của *SODFe* ở lúa và ngô [91].

Về chức năng sinh lý, nhiều bằng chứng cho thấy *SODFe* cũng như các isoform *SOD* khác tham gia trực tiếp vào cơ chế chống chịu stress hạn và mặn thông qua việc duy trì cân bằng ROS và bảo vệ cấu trúc tế bào. Hoạt tính *SOD* tăng cao đã được ghi nhận góp phần cải thiện khả năng chịu hạn, chịu mặn ở cải dầu [6] và làm giảm tổn thương oxy hóa do lạnh ở cà chua [65]. Bên cạnh đó, các điều kiện stress bất lợi thường kích hoạt mạnh mẽ sự biểu hiện của các gene *SOD*. Ở lúa mì, gene *SODMn* được cảm ứng rõ rệt dưới điều kiện hạn hán [89]; trong khi ở bông và lúa, việc biểu hiện quá mức các gene *SOD* đã được chứng minh giúp cây tăng khả năng chịu hạn, mặn, nhiệt và lạnh [126]. Những kết quả này khẳng định rằng gene mã hóa *SOD*, đặc biệt là *SODFe*, đóng vai trò quan trọng trong mạng lưới điều hòa stress oxy hóa và là mục tiêu tiềm năng cho các chiến lược cải thiện khả năng chống chịu hạn, mặn ở cây trồng thông qua chọn giống và công nghệ sinh học.

1.3.1.5. Mô hình docking phân tử *in silico*

Tương tác đặc hiệu giữa protein và nucleic acid, đặc biệt là tương tác protein - DNA, đóng vai trò cốt lõi trong điều hòa phiên mã và kiểm soát nhiều quá trình sinh học thiết yếu của tế bào. Việc xác định các vị trí gắn kết DNA cũng như các dư lượng amino acid tham gia tương tác thường được thực hiện bằng các phương pháp thực nghiệm như điện di dịch chuyển (EMSA), kết tủa miễn dịch chromatin (ChIP), tinh thể học tia X hoặc cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Các kỹ thuật này cho độ chính xác cao nhưng thường đòi hỏi chi phí lớn, thời gian nghiên cứu dài và điều kiện thí nghiệm phức tạp. Trong bối cảnh dữ liệu trình tự và cấu trúc protein ngày càng gia tăng, các phương pháp mô phỏng dựa trên tính toán đã trở thành công cụ hỗ trợ hiệu quả trong việc dự đoán và sàng lọc các tương tác phân tử.

Docking phân tử (molecular docking) là một phương pháp mô phỏng *in silico* được sử dụng nhằm dự đoán cấu hình liên kết tối ưu giữa thụ thể (receptor) và phối tử (ligand), đồng thời ước tính ái lực liên kết cũng như đặc điểm tương tác ở cấp độ phân tử. Nguyên lý của docking dựa trên việc tìm kiếm các trạng thái liên kết có

năng lượng tự do thấp nhất, bảo đảm sự bổ sung phù hợp về mặt hình học và tương tác hóa học giữa các bề mặt tiếp xúc. Trong sinh học phân tử và sinh học cấu trúc, docking được ứng dụng rộng rãi để mô phỏng các tương tác protein - protein, protein - phối tử và đặc biệt là protein - DNA [38].

Quy trình docking phân tử thường bao gồm một số bước chính. Trước hết, cấu trúc ba chiều của thụ thể và phối tử được chuẩn bị thông qua việc làm sạch dữ liệu, gán điện tích và tối ưu hóa hình học. Tiếp theo, vị trí gắn kết được xác định dựa trên dữ liệu thực nghiệm sẵn có hoặc được dự đoán thông qua các chiến lược docking không định hướng (blind docking). Sau đó, mức độ linh hoạt của phối tử, thụ thể được mô phỏng, đồng thời không gian cấu hình được khảo sát bằng các thuật toán tìm kiếm như thuật toán di truyền, Monte Carlo hoặc simulated annealing. Các kiểu liên kết được đánh giá và xếp hạng thông qua các hàm chấm điểm, phản ánh các thành phần năng lượng khác nhau như tương tác Van der Waals, lực tĩnh điện, liên kết hydrogen và ảnh hưởng của dung môi. Cuối cùng, các cấu hình tiềm năng nhất được tinh chỉnh thông qua mô phỏng động lực học phân tử (molecular dynamics, MD) nhằm đánh giá độ ổn định của phức hợp và ước tính năng lượng tự do liên kết [27].

Một trong những ưu thế nổi bật của phương pháp docking phân tử là khả năng xử lý nhanh, chi phí thấp và cung cấp thông tin chi tiết về cơ chế tương tác ở cấp độ nguyên tử. Nhờ đó, docking đặc biệt hữu ích trong việc hình thành và sàng lọc giả thuyết, định hướng thiết kế thí nghiệm cũng như hỗ trợ giải thích các kết quả thực nghiệm. Tuy nhiên, độ chính xác của các dự đoán docking phụ thuộc đáng kể vào chất lượng cấu trúc ba chiều đầu vào, mức độ mô phỏng tính linh hoạt của phân tử và sự lựa chọn hàm chấm điểm. Vì vậy, các kết quả thu được từ docking phân tử cần được xác nhận bổ sung bằng các phương pháp thực nghiệm. Trong nhiều thập kỷ qua, docking đã được ứng dụng rộng rãi để nghiên cứu tương tác protein - DNA góp phần làm sáng tỏ cơ chế nhận diện trình tự DNA của các yếu tố phiên mã thông qua các miền liên kết đặc hiệu.

Một số nghiên cứu trước đây đã khai thác mô hình docking phân tử nhằm phân tích mối quan hệ giữa protein và các vùng DNA đích. Chẳng hạn, Allen và cs (1998) đã xác định đặc điểm tương tác tại hộp GCC của phức hợp protein - DNA [7]; Chen và cs (2019) phân tích vai trò điều hòa âm của protein BlmR thuộc họ ức

chế ArsR/SmtB trong quá trình sinh tổng hợp bleomycin ở một loài vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Streptomyces* [17]; gần đây hơn, Hassan và cs (2021) đã sử dụng các tiếp cận tin sinh học, bao gồm docking, để nghiên cứu sự tiến hóa và đặc điểm chức năng của các yếu tố phiên mã DREB trong hệ gene lúa mì [43]. Mặc dù đã có bằng chứng cho thấy miền AP2 của các yếu tố phiên mã DREB chứa các dư lượng amino acid quan trọng tham gia liên kết với các motif *cis* trong vùng promoter của gene mục tiêu. Tuy nhiên, số lượng nghiên cứu ứng dụng docking phân tử để phân tích cơ chế tương tác giữa các yếu tố phiên mã và các gene đáp ứng stress phi sinh học ở thực vật, đặc biệt là đối với phân họ *GmDREB* ở đậu tương vẫn còn hạn chế.

Trong số các công cụ docking hiện nay, HADDOCK (High Ambiguity Driven biomolecular docking) được đánh giá cao nhờ khả năng tích hợp các dữ liệu thực nghiệm hoặc dự đoán tin sinh học dưới dạng ràng buộc, qua đó định hướng quá trình mô phỏng một cách hiệu quả. Quy trình docking của HADDOCK bao gồm ba giai đoạn chính: (i) sắp xếp ban đầu theo mô hình rigid-body, (ii) tinh chỉnh bán linh hoạt tại vùng giao diện liên kết và (iii) tối ưu hóa cấu trúc phức hợp trong môi trường dung môi. Hệ thống chấm điểm của HADDOCK kết hợp các thành phần năng lượng cơ học phân tử, năng lượng ràng buộc và ảnh hưởng của dung môi, đồng thời cung cấp các chỉ số đánh giá như RMSD và diện tích bề mặt tiếp xúc, cho phép lựa chọn các mô hình phức hợp có độ tin cậy cao [101].

Các nhân tố phiên mã thuộc họ AP2, đặc biệt là phân họ DREB, giữ vai trò trung tâm trong việc điều hòa biểu hiện các gene đáp ứng với các stress phi sinh học như hạn và mặn. Chức năng sinh học của các protein DREB chủ yếu được quyết định bởi khả năng nhận diện và liên kết đặc hiệu với các motif *cis* (DRE/CRT) trong vùng promoter của gene mục tiêu thông qua miền AP2 có tính bảo tồn cao. Do đó, việc làm rõ cơ chế tương tác giữa miền AP2 và DNA mục tiêu là bước then chốt để hiểu sâu bản chất phân tử của quá trình điều hòa phiên mã dưới điều kiện stress. Thông qua phân tích docking phân tử, các vị trí tương tác tiềm năng giữa protein DREB và DNA đã được dự đoán, góp phần giải thích tính đặc hiệu liên kết của từng thành viên DREB đối với các gene mục tiêu khác nhau. Đồng thời, các kết quả docking cũng cho thấy rằng những biến đổi nhỏ trong trình tự amino acid của

miền AP2 có thể dẫn đến sự thay đổi đáng kể về ái lực liên kết DNA, từ đó ảnh hưởng đến cường độ kích hoạt phiên mã và mức độ đáp ứng stress của cây [100].

Đối với cây đậu tương, mặc dù hệ gene đã được giải mã và nhiều gene *GmDREB* đã được nhận diện, số lượng nghiên cứu ứng dụng docking phân tử để phân tích tương tác protein - DNA của các yếu tố phiên mã này vẫn còn tương đối ít. Việc khai thác docking trong nghiên cứu *GmDREB* cho phép dự đoán cơ chế nhận diện trình tự DRE, xác định các dư lượng amino acid then chốt trong miền AP2 và đánh giá tiềm năng điều hòa các gene đáp ứng hạn và mặn. Những thông tin này không chỉ hỗ trợ và định hướng cho các thí nghiệm chức năng *in vivo* và *in vitro*, mà còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn các gene ứng viên triển vọng phục vụ chuyển gene và cải tiến giống.

Docking phân tử *in silico* là một công cụ mạnh trong nghiên cứu tương tác sinh học và cơ chế điều hòa gene. Việc kết hợp chặt chẽ giữa mô phỏng tính toán và dữ liệu thực nghiệm không chỉ góp phần làm sáng tỏ cơ chế hoạt động của các yếu tố phiên mã liên quan đến stress phi sinh học, mà còn tạo nền tảng khoa học vững chắc cho các nghiên cứu chức năng gene và chiến lược cải tiến giống cây trồng, bao gồm cây đậu tương, trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay.

1.3.2. Chuyển gene mã hóa nhân tố phiên mã để tăng cường khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương

1.3.2.1. Chuyển gene gián tiếp qua *Agrobacterium*

Chuyển gene là kỹ thuật đưa một đoạn DNA ngoại lai vào tế bào sinh vật nhằm tạo ra những biến đổi di truyền ổn định. Trong nghiên cứu và ứng dụng ở thực vật, các phương pháp chuyển gene thường được phân thành hai nhóm chính: chuyển gene gián tiếp và chuyển gene trực tiếp. Chuyển gene gián tiếp sử dụng sinh vật làm tác nhân trung gian, điển hình là vi khuẩn *A. tumefaciens*, trong khi các phương pháp chuyển gene trực tiếp dựa trên các tác động vật lý hoặc hóa học như bắn gene, tiêm vi mô, sử dụng liposome, sợi silicon carbide hoặc chuyển gene qua ống phân hoa. Cả hai nhóm phương pháp đều đóng vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học thực vật, góp phần cải thiện năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu của cây trồng trước các điều kiện môi trường bất lợi [9].

A. tumefaciens là vi khuẩn Gram âm có khả năng gây bệnh u rễ ở thực vật thông qua việc chuyển một đoạn DNA từ plasmid Ti vào hệ gene của cây chủ. Đoạn DNA này cho phép cây tổng hợp các hợp chất opine, nguồn cung cấp carbon và nitơ cho vi khuẩn. Quá trình chuyển gene được khởi động khi vi khuẩn nhận biết các hợp chất phenolic, điển hình là acetosyringone (AS), được tiết ra từ mô thực vật bị tổn thương. Tín hiệu này kích hoạt protein cảm biến VirA, dẫn đến phosphoryl hóa protein điều hòa VirG. VirG sau đó kích hoạt sự biểu hiện của các gene *vir* trên plasmid Ti, cho phép cắt và vận chuyển một đoạn T-DNA (khoảng 15-30 kb) vào tế bào thực vật. T-DNA được tích hợp vào hệ gene của cây chủ thông qua cơ chế tương tự quá trình liên hợp và các gene trên T-DNA sau đó được biểu hiện, kích thích sinh tổng hợp auxin và cytokinin, gây tăng sinh tế bào bất thường và hình thành khối u. Dựa trên cơ chế tự nhiên này, *A. tumefaciens* đã được khai thác và cải tiến để trở thành một trong những công cụ chuyển gene hiệu quả và phổ biến nhất trong công nghệ sinh học thực vật nhờ quy trình tương đối đơn giản, chi phí thấp và khả năng tái sinh cây cao [103].

Khả năng tái sinh của mô sau chuyển gene được xem là yếu tố quyết định đến sự thành công của kỹ thuật. Do đó, nhiều nghiên cứu đã tập trung tối ưu hóa các điều kiện chuyển gene qua *Agrobacterium* ở đậu tương nhằm nâng cao hiệu quả biến nạp. Một hướng tiếp cận đáng chú ý là bổ sung các chất chống oxy hóa vào môi trường nuôi cấy nhằm hạn chế hiện tượng chết tế bào theo chương trình. Li và cs (2017) cho thấy việc bổ sung dithiothreitol (DTT) kết hợp với kéo dài thời gian đồng nuôi cấy lên 5 ngày đạt tỷ lệ lây nhiễm trên 96% và cải thiện đáng kể hiệu quả chuyển gene [58]. Tương tự, Yang và cs (2016) báo cáo rằng việc sử dụng đơn lẻ các chất chống oxy hóa như acid α -lipoic (0,12 mM) hoặc AgNO_3 (20 μM), cũng như các tổ hợp L-cysteine (1 mM) + DTT (3,3 mM) + AgNO_3 (20 μM) hoặc L-cysteine (1 mM) + DTT (3,3 mM), đã làm giảm hiện tượng hoại tử mô, qua đó nâng cao tỷ lệ lây nhiễm và tái sinh cây [119]. Ngoài ra, Chen và cs (2018) cho thấy việc bổ sung L-glutamine, L-asparagine hoặc phối hợp cả hai vào môi trường nuôi cấy giúp tăng tỷ lệ chuyển gene lần lượt đạt $8,8 \pm 1,5\%$; $5,9 \pm 2,1\%$ và $11,0 \pm 0,0\%$, so với $3,5 \pm 2,4\%$ ở đối chứng không bổ sung [24].

Chuyển gene được xem là một công cụ hiệu quả trong việc phát triển các giống cây trồng có khả năng chịu hạn và chịu mặn thông qua việc điều chỉnh có định hướng biểu hiện gene nhằm nâng cao khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường khắc nghiệt. So với các phương pháp lai tạo truyền thống, kỹ thuật chuyển gene mang lại nhiều ưu thế, bao gồm rút ngắn thời gian chọn giống, cho phép can thiệp trực tiếp vào hệ gene và nâng cao độ chính xác trong cải thiện các tính trạng mong muốn. Tuy nhiên, do đặc điểm hệ gene phức tạp cùng với khả năng tái sinh mô hạn chế, hiệu quả và tốc độ chuyển gene ở đậu tương trong hai thập kỷ qua vẫn còn gặp nhiều thách thức. Hiệu suất chuyển gene ở đậu tương chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm đặc tính di truyền của giống, mật độ tế bào *Agrobacterium*, nồng độ và tổ hợp hormone sinh trưởng, thời gian đồng nuôi cấy và đặc biệt là khả năng tái sinh của mô cấy. Để khắc phục những hạn chế này, nhiều chiến lược cải tiến đã được đề xuất, chẳng hạn như sử dụng đa dạng nguồn vật liệu khởi đầu (nách lá mầm, lá mầm, đầu phôi, nửa hạt và hạt non), lựa chọn các tác nhân chọn lọc phù hợp như glufosinate, glyphosate hoặc hygromycin, cũng như bổ sung các amino acid hoặc chất chống oxy hóa như DTT, L-cysteine vào môi trường nuôi cấy.

1.3.2.2. Thành tựu của chuyển gene gián tiếp trong nâng cao khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương

Các yếu tố stress phi sinh học như hạn hán và mặn gây tác động nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng về cường độ và tần suất, việc cải thiện khả năng chống chịu của cây trồng trước các điều kiện môi trường bất lợi trở thành một yêu cầu cấp thiết. Công nghệ di truyền hiện đại, đặc biệt là kỹ thuật chuyển gene gián tiếp thông qua *Agrobacterium*, đã và đang đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các giống đậu tương có khả năng thích nghi tốt hơn với stress hạn và mặn. Nền tảng của các chiến lược này là việc xác định và khai thác các gene liên quan đến cơ chế chống chịu stress. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận những thành công đáng kể trong việc tạo ra các dòng đậu tương chuyển gene có khả năng chịu mặn được cải thiện. Chẳng hạn, gene *AgGlpF* đã được chuyển vào giống đậu tương Williams 82, phân tích

PCR cũng như RT-PCR xác nhận sự có mặt và biểu hiện ổn định của gene này trong hệ gene cây chủ. Các dòng chuyển gene thể hiện khả năng chống chịu mặn cao hơn so với cây đối chứng, cho thấy vai trò tích cực của *AgGlpF* trong đáp ứng stress mặn [57].

Bên cạnh đó, Ren và cs (2016) chứng minh rằng gene *GmST1* có khả năng làm giảm sự tích lũy các loại oxy phản ứng (ROS) và làm tăng độ nhạy với tín hiệu ABA dưới điều kiện mặn, qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của gene này trong cải thiện tính chịu mặn ở cả đậu tương và *A. thaliana* [93]. Ngoài ra, khi xử lý với NaCl ở nồng độ 100 mM, mức biểu hiện của gene *GmPIP1.6* được ghi nhận tăng mạnh ở cả rễ và lá, phản ánh vai trò của gene này trong điều hòa vận chuyển nước và đáp ứng với stress mặn [131].

Ở giống đậu tương NY-1001, việc chuyển gene *StP5CS* thông qua *Agrobacterium* đã tạo ra các dòng chuyển gene đồng hợp tử ở các thế hệ T2 và T3. Khi được đánh giá trong điều kiện trồng chậu và thủy canh, các dòng này cho thấy sự cải thiện rõ rệt về chiều cao cây, diện tích lá, hàm lượng diệp lục và số quả tươi so với cây đối chứng, chứng tỏ vai trò của *StP5CS* trong tăng cường khả năng thích nghi với stress [122]. Tương tự, gene *GmNFYA* khi được biểu hiện mạnh trong các dòng đậu tương chuyển gene đã kích hoạt nhiều gene đáp ứng stress, từ đó góp phần nâng cao khả năng chịu mặn [69]. Một nghiên cứu khác cũng đã chuyển gene *PgTIP1* vào đậu tương, tạo ra các dòng L19 và L29 với khả năng chống chịu mặn được cải thiện, thể hiện thông qua các thay đổi sinh lý như điều chỉnh hoạt động khí khổng, giảm tốc độ hấp thu nước và hạn chế sự tích lũy ion Na^+ và Cl^- trong mô thực vật [8].

1.3.2.3. Nghiên cứu biểu hiện gene *DREB* và tăng cường khả năng chịu hạn, chịu mặn ở đậu tương

Chuyển gene được xem là một trong những công cụ hiệu quả của công nghệ sinh học hiện đại nhằm cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn của cây trồng thông qua việc điều chỉnh có định hướng biểu hiện của các gene đáp ứng stress phi sinh học. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng, dẫn đến suy giảm nguồn nước tưới và gia tăng xâm nhập mặn tại nhiều vùng sản xuất nông nghiệp, việc xác định và

khai thác các gene liên quan đến cơ chế thích nghi với điều kiện thiếu nước và độ mặn cao có ý nghĩa quan trọng đối với các chương trình cải tiến giống đậu tương.

Nhiều nghiên cứu cho thấy các gene điều hòa, đặc biệt là các gene mã hóa nhân tố phiên mã, giữ vai trò trung tâm trong việc kiểm soát mạng lưới biểu hiện gene đáp ứng stress. Khi thực vật chịu tác động của các yếu tố bất lợi, tín hiệu stress trước tiên được tiếp nhận và truyền vào trong tế bào thông qua các con đường truyền tín hiệu đặc hiệu, từ đó hoạt hóa các nhân tố phiên mã và điều hòa biểu hiện của các gene mục tiêu liên quan đến đáp ứng stress. Quá trình điều hòa này dẫn đến sự kích hoạt nhiều cơ chế bảo vệ ở cấp độ sinh lý và sinh hóa. Trong đó, hệ thống chống oxy hóa được tăng cường thông qua hoạt động của enzyme SODFe nhằm loại bỏ các dạng oxy phản ứng (ROS), đồng thời con đường sinh tổng hợp proline được hoạt hóa thông qua enzyme P5CS để duy trì cân bằng áp suất thẩm thấu. Sự phối hợp của các cơ chế này góp phần bảo vệ cấu trúc tế bào, duy trì cân bằng nội môi và nâng cao khả năng chống chịu của thực vật trong điều kiện stress kéo dài.

Trong số các nhân tố phiên mã liên quan đến stress, các protein thuộc phân họ DREB của họ AP2 đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ vai trò trực tiếp trong điều hòa đáp ứng hạn, mặn và nhiệt độ. Kidokoro và cs (2015) đã đánh giá tác động của việc tăng cường biểu hiện gene *GmDREB1* trong cây *A. thaliana* chuyển gene. Kết quả cho thấy các dòng biểu hiện quá mức *GmDREB1* không chỉ thể hiện khả năng chịu lạnh được cải thiện mà còn tăng cường khả năng chống chịu với nhiệt độ cao và hạn hán. Hiệu quả này được cho là bắt nguồn từ khả năng của *GmDREB1* trong việc kích hoạt đồng thời nhiều gene đáp ứng stress, qua đó nâng cao tính linh hoạt và hiệu quả của hệ thống thích nghi ở thực vật [52].

Trong một nghiên cứu độc lập, Zhou và cs (2020) đã đánh giá tiềm năng ứng dụng của gene *GmDREB1* thông qua việc chuyển gene này vào hai giống lúa mì đang được trồng phổ biến. Các dòng cây chuyển gene thể hiện sự cải thiện rõ rệt về năng suất cũng như các chỉ tiêu sinh lý khi sinh trưởng trong điều kiện thiếu nước so với cây đối chứng. Cụ thể, năng suất hạt của các dòng chuyển gene tăng từ 4,79-18,43%, qua đó cho thấy *GmDREB1* có tiềm năng ứng dụng trong việc duy trì và nâng cao năng suất cây trồng dưới tác động của stress phi sinh học [129].

Trong phân họ *DREB*, *GmDREB2* được xác định là một nhân tố điều hòa quan trọng tham gia kiểm soát phản ứng của cây đối với các điều kiện môi trường bất lợi. Biến thể *GmDREB2A* được ghi nhận là cảm ứng mạnh dưới các điều kiện khô hạn, nhiệt độ cao và giá lạnh [72]. Các nghiên cứu của Chen và cs (2007), Dao và cs (2015), Chen và cs (2016), Phạm và cs (2020) cho thấy việc biểu hiện quá mức *GmDREB2* giúp tăng đáng kể khả năng chịu hạn và chịu mặn ở các dòng cây chuyển gene [19], [28], [88]. Theo Phạm và cs (2020), mức biểu hiện tăng cường của *GmDREB2* ở thể hệ T2 đã kích hoạt mạnh mẽ sự phiên mã của gene *P5CS*, với mức tăng từ 1,37 - 1,95 lần ($p < 0,05$). Song song với đó, hàm lượng proline một chất điều hòa thẩm thấu quan trọng cũng tăng đáng kể. Cụ thể, proline tích lũy ở các dòng chuyển gene tăng từ 155,81 - 187,42% sau 5 ngày xử lý hạn và từ 180,52 - 233,74% sau 9 ngày xử lý hạn ($p < 0,05$), góp phần nâng cao khả năng thích nghi của cây trước stress thiếu nước [88].

GmDREB6 được xác định là một gene cảm ứng mạnh và có vai trò tích cực trong tăng cường khả năng chịu mặn ở các hệ thống cây chuyển gene [82], [109]. Nguyễn và cs (2019) cho thấy, ở các dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB6* thể hệ T2, mức phiên mã của *GmP5CS* tăng từ 1,36 - 2,01 lần trong điều kiện bình thường và từ 1,58 - 3,16 lần dưới stress mặn hoặc hạn so với cây đối chứng. Hàm lượng proline ở các dòng chuyển gene (T2-2, T2-4, T2-7 và T2-10) dao động trong khoảng 0,82 - 4,03 $\mu\text{mol/g}$, trong đó dòng T2-7 đạt giá trị cao nhất (7,77 $\mu\text{mol/g}$). Sau 7 ngày xử lý mặn, hàm lượng proline ở các dòng chuyển gene tăng từ 247,83 - 300%, cao hơn so với mức tăng 238,22% ở cây đối chứng. Những kết quả này cho thấy *GmDREB6* là một ứng viên triển vọng trong cải thiện khả năng chịu mặn ở đậu tương [82]. Bảng 1.1 thống kê kết quả biểu hiện kiểu hình chống chịu stress phi sinh học của cây chuyển gene *DREB* ở một số giống cây trồng và đậu tương. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều gene *DREB* khác của đậu tương, như *GmDREB5* và *GmDREB7*, mà chức năng sinh học trong điều kiện stress phi sinh học chưa được làm rõ và cần tiếp tục được nghiên cứu chuyên sâu.

Về mặt cơ chế, các nhân tố phiên mã DREB tăng cường khả năng chống chịu stress chủ yếu thông qua điều hòa biểu hiện của các gene mục tiêu và các quá trình sinh lý liên quan. Các gene như *DREB1A*, *DREB2A* và *DREB7* đã được

chứng minh có khả năng kiểm soát biểu hiện của *RD29A*, một gene đáp ứng stress liên quan đến khả năng chịu lạnh và khô hạn, ở cả *A. thaliana* [64] và cây thuốc lá [83]. Đồng thời, việc tăng cường biểu hiện *GmDREB2* và *GmDREB6* ở đậu tương cũng dẫn đến sự hoạt hóa gene *P5CS* và thúc đẩy quá trình tích lũy proline, góp phần quan trọng vào cơ chế điều hòa thẩm thấu và thích nghi với các điều kiện môi trường bất lợi [82], [88], [109].

Bảng 1.1. Các gene *DREB* được sử dụng trong chuyển gene nhằm nâng cao khả năng chống chịu stress phi sinh học ở cây trồng và đậu tương

Gene	Đối tượng	Kiểu hình	Tài liệu tham khảo
<i>ZmDREB2A</i>	Ngô	Chịu hạn và băng giá	[90]
<i>DREB</i>	Lúa mì	Chịu hạn, mặn, lạnh với tốc độ tăng trưởng giảm	[75]
<i>DREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu hạn	[84]
<i>OsDREB1A</i>	Lúa	Chịu hạn, mặn, băng giá	[47]
<i>OsDREB1B</i>	Thuốc lá	Chịu hạn, mặn	[39]
<i>JfDREB1A</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu lạnh	[41]
<i>OsDREB</i>	Lúa	Chịu mặn	[32]
<i>ScDREB2B-1</i>	Thuốc lá	Chịu hạn	[25]
<i>GmDREB1</i>	Lúa mì	Chịu hạn, mặn	[48]
<i>GmDREB2</i>	Đậu tương	Chịu hạn, mặn	[88]
<i>EcDREB2A</i>	Thuốc lá	Chịu nhiệt	[99]
<i>SlDREBA4</i>	Cà chua	Chịu nhiệt	[70]
<i>GmDREB6</i>	Đậu tương	Chịu mặn	[109]
<i>MsDREB6.2</i>	Táo	Chịu hạn	[60]
<i>AnDREB5.1</i>	Thuốc lá	Chịu lạnh, thẩm thấu	[134]
<i>ScDREB5</i>	<i>Arabidopsis</i>	Chịu muối	[63]
<i>AtDREB1A</i>	Lạc	Chịu hạn	[12]

Các bằng chứng thực nghiệm cho thấy việc biểu hiện mạnh các gene *DREB* có thể cải thiện đáng kể khả năng chống chịu stress phi sinh học của cây trồng trong cả điều kiện nhà kính và ngoài đồng ruộng. Đáng chú ý, các cây chuyển gene biểu hiện *DREB* không chỉ thích nghi tốt hơn với các điều kiện khắc nghiệt mà còn duy trì được năng suất tương đối ổn định. Những kết quả này khẳng định rằng việc điều

hòa tăng cường biểu hiện các nhân tố phiên mã cảm ứng stress như *DREB* có thể kích hoạt hiệu quả các gene mục tiêu mang motif DRE trong vùng promoter, từ đó góp phần nâng cao khả năng chịu hạn và chịu mặn ở cây đậu tương.

1.3.3. Nhận xét

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 trên phạm vi toàn cầu, trong đó đậu tương là loài có mức độ nhạy cảm cao. Các điều kiện stress này 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), từ đó ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng và năng suất của cây.

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 mục tiêu 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 phân 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 mục tiêu, đang được ứng dụng nhằm dự đoán cơ chế điều hòa và định hướng lựa chọn các gene có tiềm 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 mặn và chịu hạn tốt hơn.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.1.1. 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.

DT26 là giống đậu tương có khả năng sinh trưởng ổn định, thích nghi tốt với điều kiện sinh thái Việt Nam và đã được xây dựng quy trình tái sinh, chuyển gene qua *Agrobacterium tumefaciens* tại phòng thí nghiệm. Được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu và phát triển đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (PL6) [3].

2.1.2. 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.

2.1.3. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Các loại kit thao tác phân tử thuộc hãng Bio-Neer, Fermentas: Kit Trizol Reagents để tách chiết RNA tổng số; kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis để tổng hợp cDNA; kit Gene JET PCR Purification để tinh sạch sản phẩm PCR; kit Plasmid Extraction để tách chiết plasmid từ vi khuẩn.

Các enzyme cắt giới hạn và enzyme nối bao gồm *Bam*HI, *Not*I, *Nco*I, *Sac*I và T4 DNA ligase, cùng với thang DNA chuẩn 1 kb và thang protein chuẩn 1 kDa, được cung cấp bởi hãng Fermentas.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: 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 Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số nhà cung cấp thương mại khác.

Các thiết bị chính được sử dụng bao gồm: máy PCR System 9700 (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), hệ thống điện di PowerPac 300 (Bio-Rad, Hoa Kỳ), máy soi gel DNA Mini-Transilluminator (Bio-Rad, Hoa Kỳ), máy vortex (IKA, Đức), máy ly tâm, máy xung điện Gene Pulser, máy đo hàm lượng acid nucleic NanoDrop, cùng các thiết bị hỗ trợ hiện đại khác phục vụ cho nghiên cứu sinh học phân tử và nuôi cấy mô thực vật.

2.1.4. Các trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu

Các cặp môi đặc hiệu được sử dụng trong các phản ứng PCR và colony-PCR có ký hiệu và trình tự nucleotide tương ứng, được trình bày chi tiết trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Thông tin về trình tự nucleotide của các cặp môi PCR

Cặp môi	Trình tự nucleotide (5' -3')
GmDREB5-F/MYC-KDEL-R	TCTCGCATATCCACCCATCATAG TCACAGCTCGTCCTTCAGATCC
qRT_GmDREB5-F/ qRT_GmDREB5-R	TGGGATGATTTGGATGCCACC CTTCCACAAGTAACCTGGTCC
qRT_P5CS-F/qRT_P5CS-R	TGCTCGTGAGATGGCAGTTGC AGCCTGTTGAGCAGCAACCAC
qRT_NtSODFe-F/qRT_NtSODFe-R	CTC GTGTCATGG GAAGCAGT CGTGCC TGC TATATT TGC CTC
qRT_NtAct-F/qRT_NtAct-R	AAGGGATGCGAGGATGGA CAAGGAAATCACCGCTTTGG
GmDR-F/MYC-R	ATGTTTTCCATCAATCATTTCTCC AAGTTCATCCTTCAGGTCCTC
qRT-DREB7-F/qRT-DREB7-R	TGCCGGAGTATCTGAGGAAC
	CTGAGATCAGCTTCTGCTCC
qRT-P5CSF/qRT-P5CSR	TGCTCGTGAGATGGCAGTTGC
	AGCCTGTTGAGCAGCAACCAC
qRT-ActNF/qRT-ActNR	GATCTTGCTGGTCGTGATCTT GTCTCCAACCTTTGCTCATAGTC

2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN

Các thí nghiệm của luận án được thực hiện tại các phòng thí nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên và tại Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm - Đại học Thái Nguyên.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nhóm phương pháp tin sinh học

2.3.1.1. Thu thập dữ liệu về các gene thuộc họ AP2 và phân họ DREB

Trình tự nucleotide của các gene thuộc họ AP2, phân họ DREB, cũng như vùng mã hóa miền AP2 trong protein DREB của *A. thaliana* và đậu tương được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI/GenBank [78], [79], [80].

2.3.1.2. Phân tích đặc điểm và tiến hóa phân tử của các gene họ AP2, phân họ gene DREB và miền AP2 trong protein DREB

Các trình tự nucleotide của các gene thuộc họ AP2 và phân họ DREB, cùng với trình tự amino acid của miền AP2 trong protein DREB, được phân tích đặc điểm và mối quan hệ tiến hóa bằng phần mềm MEGA11 [107]. Các trình tự được căn chỉnh bằng thuật toán ClustalW trước khi xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) với mô hình Tamura - Nei [106]. Độ tin cậy của cây tiến hóa được đánh giá thông qua phân tích bootstrap với 1.000 lần lặp nhằm xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các gene và miền AP2 ở hai loài nghiên cứu [33].

2.3.2. Nhóm phương pháp thiết kế gene, vector chuyển gene và chuyển gene gián tiếp qua *A. tumefaciens*

2.3.2.1. Thiết kế vector chuyển gene và tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp

Thiết kế và tổng hợp gene *GmDREB5*: Trình tự gene *GmDREB5* được thiết kế dựa trên dữ liệu công bố trong GenBank (có mã số FR822737.1 [26]). Trong quá trình thiết kế, vị trí cắt của enzyme *AscI* được bổ sung ở đầu 5', trong khi ở đầu 3' lần lượt gắn thêm trình tự mã hóa thẻ c-MYC, tín hiệu định vị KDEL và vị trí cắt của enzyme *BamHI*. Trình tự *GmDREB5-syn* được tổng hợp tại công ty Twist

Bioscience, 681 Gateway Blvd; South San Francisco, CA 94080 (Hoa Kỳ) và gắn vào vector nhân dòng pTWIST, tạo vector tái tổ hợp (*pTWIST_GmDREB5-syn*).

Thiết kế vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5*: Vector *pTWIST_GmDREB5-syn* được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli*, sau đó được tách chiết thu nhận plasmid tinh sạch. Vector biểu hiện pFGC5941 và plasmid *pTWIST_GmDREB5-syn* được xử lý đồng thời bằng hai enzyme giới hạn *AscI* và *BamHI* để thu đoạn gene *GmDREB5* và mở vòng vector pFGC5941 (Thành phần phản ứng cắt gồm 3 μ L đệm cắt 10x, 1 μ L enzyme *AscI* 10 u, 1 μ L enzyme *BamHI* 10 u, 1 μ g DNA plasmid và nước khử ion bổ sung đến thể tích 30 μ L). Gene *GmDREB5* được ghép nối vào vector biểu hiện pFGC5941 bằng enzyme nối T4 DNA ligase để tạo vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5* (Thành phần phản ứng ghép nối bao gồm 2 μ L đệm T4 ligase 10x; 1 μ L T4 DNA ligase 10 u; 30 ng vector pFGC5941; 10 ng đoạn gene *GmDREB5* và nước khử ion bổ sung đến thể tích 20 μ L).

Nhân dòng và sàng lọc vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5*: Vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* và các dòng khuẩn lạc dương tính được sàng lọc bằng phản ứng colony PCR với cặp mồi GmDREB5-F/MYC-KDEL-R. Thành phần phản ứng PCR gồm 7,5 μ L Master Mix 2x, 0,5 μ L mỗi mồi (10 pM) và 15 μ L nước khử ion. Chu trình PCR được thực hiện với bước biến tính ban đầu ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 27 chu kỳ gồm 94°C/30 giây, 55°C/30 giây và 72°C trong 1 phút; kết thúc bằng bước kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Tạo chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp: Vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5* được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1. Các dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với hai cặp mồi GmDREB5-F/MYC-KDEL-R và BarR3-F/BarR1-R.

Đặc điểm của gene *GmDREB7* và vecto chuyển gene pBI121_ *GmDREB7*

Trình tự gene *GmDREB7* có cấu trúc thiết kế bao gồm vùng mã hóa của *GmDREB7* gồm 624 bp, trình tự mã hóa kháng nguyên c-MYC (33 bp), đoạn KDEL (12 bp) và các vị trí cắt của enzyme hạn chế *XbaI*, *BamHI*, *XmaI*, *SacI* (PL13) [83].

Cấu trúc pBI121_GmDREB7 được thiết kế với promoter CaMV35S, gene *GmDREB7*, c-MYC, KDEL và các vị trí cắt của enzyme giới hạn *XbaI*, *BamHI*, *XmaI*, *SacI*. Vector pBI121_DREB7 chứa gene *KanR*, mã hóa neomycin-phosphotransferase II (nptII) [83].

2.3.2.2. Chuyển gene gián tiếp vào thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*

Chuyển gene *GmDREB5* vào cây thuốc lá (*N. tabacum*) được thực hiện bằng phương pháp chuyển gene gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*, dựa trên quy trình cải tiến từ Topping (1998) [108]. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá được thể hiện trong phụ lục 7 (PL7).

Chuẩn bị vật liệu thực vật: Hạt thuốc lá được khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 20 giây, sau đó xử lý bằng dung dịch Javel 30% (v/v) có bổ sung Tween 20 0,05% trong 20 phút. Sau xử lý, hạt được rửa sạch năm lần bằng nước cất vô trùng và gieo trên môi trường MS cơ bản. Cây con được nuôi cấy trong điều kiện vô trùng, chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 3 - 5 tuần, khi cây đạt giai đoạn 3 - 4 lá thật, các lá non khỏe mạnh được thu nhận làm mẫu biến nạp.

Biến nạp và đồng nuôi cấy: Lá thuốc lá được cắt thành các mảnh có kích thước xấp xỉ 1 cm² và ngâm trong dịch huyền phù *A. tumefaciens* AGL1 mang vector tái tổ hợp pFGC_GmDREB5, với mật độ quang OD₆₀₀ $\approx$ 0,7 trong 10 phút. Sau đó, các mảnh lá được thấm khô trên giấy lọc vô trùng và chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy (MS bổ sung BAP 1,0 mg/L, sucrose 30 g/L và agar 8 g/L). Quá trình đồng nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện tối hoàn toàn trong 48 giờ.

Tái sinh chồi và chọn lọc: Sau giai đoạn đồng nuôi cấy, các mẫu được chuyển sang môi trường tái sinh chồi và chọn lọc, gồm môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/L, glufosinate-ammonium 2,0 mg/L (chất chọn lọc), cefotaxime 400 mg/L (ức chế *Agrobacterium*), sucrose 30 g/L và agar 8 g/L. Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau khoảng 15 ngày, các chồi sống sót và sinh trưởng tốt được tách riêng để tiếp tục nuôi cấy.

Ra rễ và hoàn thiện cây chuyển gene: Các chồi tái sinh được chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ (MS bổ sung IBA 0,2 mg/L, glufosinate-ammonium 2,0 mg/L và cefotaxime 400 mg/L). Khi hệ rễ hình thành ổn định, cây được chuyển sang môi

trường MS không chứa chất chọn lọc, bổ sung IBA 0,2 mg/L và giảm nồng độ cefotaxime xuống 250 mg/L nhằm tạo điều kiện cho cây phát triển hoàn chỉnh.

Thu nhận cây chuyển gene và thiết kế đối chứng: Các cây có hệ rễ khỏe mạnh được thích nghi dần và chuyển ra trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới.

Các cây thuốc lá tái sinh từ các mẫu biến nạp gene *GmDREB5* trong ống nghiệm và trồng trên giá thể được gọi là cây thế hệ TG0. Các cây thuốc lá nảy mầm từ hạt của cây TG0 được gọi là cây thế hệ TG1.

Các nghiệm thức đối chứng bao gồm: (i) đối chứng âm ĐC0 - mảnh lá không biến nạp, nuôi cấy trên môi trường không chứa chất chọn lọc; (ii) đối chứng âm ĐC1-mảnh lá không biến nạp, nuôi cấy trên môi trường có bổ sung glufosinate-ammonium. Các đối chứng được sử dụng để đánh giá hiệu quả chọn lọc và loại trừ ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy.

2.3.2.3. Chuyển gene gián tiếp vào đậu tương thông qua *A. tumefaciens*

Phương pháp chuyển gene gián tiếp thông qua *A. tumefaciens* sử dụng mô nách lá mầm đậu tương được thực hiện theo quy trình đã công bố của Olhoft và cs (2006) [86] và Yang và cs (2016) [119]. Thành phần môi trường chuyển gene vào đậu tương trình bày tại Phụ lục 8 (PL8).

Chuẩn bị vật liệu thực vật: Hạt đậu tương được khử trùng bề mặt bằng khí clo sinh ra từ hỗn hợp javen (100 mL), HCl đậm đặc (3 mL) và đặt trong tủ hút 14 -16 h, sau đó được cho nảy mầm trên môi trường MS. Sau 5 -7 ngày nuôi cấy, lá mầm được tách đôi theo chiều dọc, loại bỏ hoàn toàn đỉnh sinh trưởng. Phần nách lá mầm còn lại được sử dụng làm vật liệu biến nạp và tiếp tục nuôi cấy *in vitro*.

Chuẩn bị chủng vi khuẩn *A. tumefaciens*: Chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp được nuôi trong 15 mL môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L ở 28°C, lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Sau đó, dịch nuôi được chuyển sang 50 mL môi trường LB không kháng sinh và nuôi phục hồi cho đến khi mật độ tế bào đạt $OD_{600} = 0,8$. Sinh khối vi khuẩn được thu bằng ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút và hòa tan trong 40 mL môi trường CCM, giữ lạnh cho đến khi sử dụng.

Lây nhiễm và đồng nuôi cấy: Các mảnh lá mầm được gây tổn thương cơ học tại vị trí nách lá mầm bằng dao vô trùng, sau đó ngâm trong huyền phù *A. tumefaciens*

trong 30 phút. Mẫu được chuyển sang môi trường CCM đặc không kháng sinh để đồng nuôi cấy trong điều kiện tối, ở 25°C trong 5 ngày.

Cảm ứng tái sinh chồi và chọn lọc: Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được rửa nhẹ trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM) có bổ sung kháng sinh cefotaxime 500 mg/L trong 10 phút, thấm khô và đặt lên môi trường SIM đặc có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/L cho chọn lọc thứ nhất. Sau 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM mới bổ sung kháng sinh kanamycin 75 mg/L và cefotaxime 500mg/L cho lần chọn lọc thứ hai.

Kéo dài chồi, tạo rễ và tái sinh cây hoàn chỉnh: Các cụm chồi sống sót được chuyển sang môi trường kéo dài chồi (SEM) có bổ sung kháng sinh cefotaxime 500 mg/L và kanamycin 50 mg/L. Khi chồi đạt chiều cao 3 - 4 cm, chúng được chuyển sang môi trường tạo rễ (RM) có bổ sung kháng sinh cefotaxime 250 mg/L và kanamycin 50 mg/L để hình thành rễ và tái sinh cây hoàn chỉnh.

Trồng cây ngoài giá thể: Các cây tái sinh khỏe mạnh được đưa ra trồng trên giá thể gồm trấu hun và cát theo tỷ lệ 1:1. Sau thời gian thích nghi từ 1 - 2 tuần, các cây sống sót được chuyển trồng trong nhà lưới. Thời gian biến nạp và tái sinh được tính toán hợp lý để đảm bảo cây chuyển gene sinh trưởng phù hợp với thời vụ gieo trồng đậu tương. Các cây đậu tương tái sinh từ các mẫu biến nạp gene *GmDREB7* trong ống nghiệm và trồng trên giá thể được gọi là cây TG0. Các cây đậu tương nảy mầm từ hạt của các cây TG0 được gọi là cây thế hệ TG1.

2.3.3. Nhóm phương pháp phân tích biểu hiện gene

2.3.3.1. Phương pháp xử lý dòng chuyển gene bằng stress mặn

Xử lý dòng thuốc lá chuyển gene: Cây thuốc lá không chuyển gene (WT) và dòng chuyển gene TG0 được chuyển từ bình nuôi cấy sang chậu có kích thước 115×85×105 mm, chứa giá thể gồm đất hữu cơ, đất phù sa, hỗn hợp xốp, than hoạt tính và vi sinh vật. Xử lý mặn được tiến hành bằng cách tưới 50 mL dung dịch NaCl 250 mM cho nhóm thí nghiệm, trong khi nhóm đối chứng được tưới 50mL nước cất. Quá trình xử lý 3 lần, mỗi lần tưới cách nhau 3 ngày. Mẫu lá của WT và cây chuyển gene được thu thập vào ngày thứ 10 (sau lần xử lý thứ ba) để phục vụ phân tích biểu hiện gene.

Xử lý dòng đậu tương chuyển gene: Ở giai đoạn phát triển ba lá (V3), các cây thuộc 4 dòng chuyển gene TG1 và cây WT được xử lý mặn bằng dung dịch NaCl với thể tích 50 mL ở hai nồng độ 150 mM và 250 mM. Việc xử lý stress mặn được thực hiện ba lần liên tiếp, mỗi lần cách nhau ba ngày. Trong đó, lần đầu tiên sử dụng dung dịch NaCl 150 mM và hai lần tiếp theo sử dụng dung dịch NaCl 250 mM. Xử lý stress hạn bằng cách không tưới nước trong 9 ngày. Đối với nhóm đối chứng, cả cây chuyển gene TG1 và WT được tưới bằng 50 mL nước theo cùng một lịch trình. Các mẫu được phân tích từ ngày thứ 10 sau khi xử lý stress.

2.3.3.2. Phương pháp xác định sự có mặt của gene chuyển

Xác định sự có mặt của gene chuyển *GmDREB5* trong cây thuốc lá: Phản ứng RT-PCR được sử dụng nhằm xác định sự biểu hiện của gene chuyển *GmDREB5* trong các dòng cây thuốc lá chuyển gene. Tổng số RNA được tách chiết từ lá cây thuốc lá bằng thuốc thử Trizol® LS theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ambion-Life Technology Corporation, Hoa Kỳ). Chất lượng và độ nguyên vẹn của RNA được đánh giá bằng điện di trên gel agarose 1%. Sử dụng bộ kit RevertAid First Strand (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) để tổng hợp cDNA từ RNA tổng số đã tách chiết theo quy trình chỉ dẫn của nhà sản xuất. Sau đó cDNA được dùng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu *GmDREB5*-F/MYC-KDEL-R. Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: 7,5 µL PCR Master mix 2x; 0,5 µL mồi xuôi; 0,5 µL mồi ngược (10 pmol); 1 µL cDNA và nước không chứa nuclease bổ sung đến 15 µL. Chu trình nhiệt bao gồm: biến tính ban đầu 94°C/3 phút; 27 chu kỳ với 94°C/30 giây, 62°C/30 giây, 72°C/1 phút; và kéo dài ở 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% để xác định sự có mặt của gene *GmDREB5*.

Xác nhận sự có mặt của gene chuyển *GmDREB7* trong cây đậu tương: RNA tổng số được tách chiết từ lá non của cây đậu tương biến đổi gene và cây đối chứng WT bằng bộ kit Trizol. Sau đó, cDNA được tổng hợp bằng bộ First Strand cDNA Synthesis Kit. Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại gene *GmDREB7* sử dụng cặp mồi *GmDR*-F/*Cmyc*-R. Kích thước dự kiến của đoạn gene *GmDREB7* được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

2.3.3.3. Phân tích sự biểu hiện của gene chuyển

Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp ở các dòng thuốc lá chuyển gene

Protein tổng số được tách chiết từ lá của ba dòng cây thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* (TG02, TG08 và TG015) và cây WT. Các mẫu protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 10%, theo quy trình chuẩn do Laemmli (1970) mô tả [56]. Sau khi điện di, protein được chuyển từ gel sang màng nitrocellulose. Màng sau đó được ủ trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS) có bổ sung 5% sữa gầy và Tween, ủ qua đêm nhằm hạn chế hiện tượng gắn kết không đặc hiệu. Tiếp theo, màng được ủ với kháng thể sơ cấp trong điều kiện lắc nhẹ 3 giờ. Sau bước này, màng được rửa ba lần bằng dung dịch PBS 1x, trước khi tiếp tục ủ với kháng thể thứ cấp trong 2 giờ. Kháng thể sơ cấp sử dụng là kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu với epitope c-Myc, được pha loãng ở tỷ lệ 1:700 trong dung dịch PBS chứa 5% sữa gầy. Kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng IgG chuột liên hợp với enzyme peroxidase (horseradish peroxidase, HRP), được pha loãng ở tỷ lệ 1:4.000 trong cùng dung dịch chặn. Tín hiệu protein được phát hiện bằng cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) [104].

Phân tích sự biểu hiện của gene chuyển và gene mục tiêu: Mức độ biểu hiện của các gene *GmDREB5*, *NtP5CS*, *NtSODFe* ở cây thuốc lá biến đổi gene; *GmDREB7* và *GmP5CS* ở cây đậu tương biến đổi gene và cây WT dưới điều kiện không xử lý và xử lý mặn được phân tích bằng phương pháp qRT-PCR (Quantitative Real-Time Reverse Transcription PCR). Gene tham chiếu sử dụng trong phân tích là *SAC1* (GenBank: J01298.1). Phản ứng qRT-PCR thời gian thực được thực hiện trong thể tích 20 μ L, bao gồm 10 U SYBR Premix Ex Taq II, 1,5 μ L hỗn hợp mỗi 10 mM (gồm mỗi xuôi và mỗi ngược), nước khử ion không chứa DNase và 1 μ L cDNA. Chu trình nhiệt của qRT-PCR gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm 95°C trong 10 giây, giai đoạn bắt cặp mỗi ở 60 - 62°C trong 20 giây và giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 20 giây. Mỗi phản ứng được lặp lại ba lần. Kết quả được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Q-Rex phiên bản 1.0.0. Mức độ biểu hiện gene được xác định theo phương pháp Livak tính toán theo công thức $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ [66].

2.3.3.4. *Đánh giá chức năng sinh học của gene chuyển*

Phương pháp đánh giá nhanh khả năng chịu hạn, chịu mặn ở giai đoạn cây non được xác định theo Lê Trần Bình và đtg (1998) [1]. Hạt đậu tương DT26 nghiên cứu được gieo vào các chậu có kích thước như nhau. Tưới lượng nước nhất định cho các chậu đến khi cây hình thành 3 lá. Sau đó ngừng tưới nước, xử lý stress mặn và đánh giá tác động của hạn, mặn ở các ngưỡng thời gian 5, 7 và 9 ngày xử lý. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Theo dõi chỉ tiêu liên quan đến khả năng chịu hạn, chịu mặn trước và sau khi gây stress hạn, mặn như sau:

+ Tỷ lệ cây héo, tỷ lệ cây chết

+ Xác định chỉ số chịu hạn, chịu mặn tương đối (S) ở giai đoạn cây non. Chỉ số chịu hạn, chịu mặn được đánh giá bằng diện tích hình rada biểu diễn trong hệ tọa độ đa trục theo công thức:

$$S = (0,5 \cdot \sin \alpha) (ab+bc+cd+de+eg+gh+hi+ik+ka); \text{ với } \alpha = 360^\circ/9$$

Trong đó: S = Chỉ số chịu hạn, chịu mặn tương đối

a = Tỷ lệ cây héo sau 5 ngày xử lý hạn, mặn

b = Tỷ lệ cây chết sau 5 ngày xử lý hạn, mặn

c = Tỷ lệ cây héo sau 7 ngày xử lý hạn, mặn

d = Tỷ lệ cây chết sau 7 ngày xử lý hạn, mặn

e = Tỷ lệ cây héo sau 9 ngày xử lý hạn, mặn

g = Tỷ lệ cây chết sau 9 ngày xử lý hạn, mặn

h = Hàm lượng proline ở điều kiện thường

I = Hàm lượng proline sau 5 ngày xử lý hạn, mặn

k = Hàm lượng proline sau 9 ngày xử lý hạn, mặn

Hàm lượng proline ở các dòng cây chuyển gene và cây đối chứng được xác định theo phương pháp của Bates và cs. (1973) [11]

Hàm lượng protein hòa tan được xác định theo phương pháp Lowry, kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm khối lượng chất khô theo hướng dẫn của Nguyễn Văn Mùi [2].

Hàm lượng lipid trong mẫu được định lượng bằng phương pháp chiết Soxhlet, tính toán dựa trên chênh lệch khối lượng mẫu trước và sau quá trình chiết xuất, quy đổi về phần trăm theo khối lượng khô tuyệt đối [2].

2.3.4. Phương pháp docking phân tử

Xây dựng mô hình cấu trúc ba chiều của protein và DNA: Dựa trên đặc điểm và chức năng của các hộp trong vùng khởi động của các gene mục tiêu *NtP5CS* và *NtSODFe*, trình tự vùng khởi động được thiết kế chứa các motif DRE/CRT, ABRE, GT-1 (Bảng 2.2) và các đoạn đệm để tăng tính ổn định của cấu trúc.

Các mô hình cấu trúc ba chiều của DNA promoter mục tiêu, với các trạng thái uốn cong khác nhau dưới dạng β -DNA, được xây dựng bằng phần mềm Avogadro phiên bản 1.2.0 [42], sau đó được tối ưu hóa năng lượng trước khi sử dụng cho phân tích docking. Trình tự gene *GmDREB5* được truy xuất từ cơ sở dữ liệu GenBank (số truy cập FR822737.1; Gene ID: 100809887) và trình tự *GmDREB7* có số truy cập NM_001248108.2, Gene ID:100101894. Vùng mã hóa protein DREB5 và DREB7 được xác định, trong đó miền AP2 đặc trưng được tách riêng để phục vụ cho phân tích tương tác. Cấu trúc không gian ba chiều của miền AP2 được dự đoán bằng công cụ AlphaFold dựa trên trình tự amino acid tương ứng [50].

Mô phỏng docking phân tử giữa protein và DNA: Quá trình tương tác phân tử giữa miền AP2 của protein *GmDREB5*, *NtP5CS*, *NtSODFe* và *GmDREB7* với trình tự DNA promoter mục tiêu được thực hiện bằng phần mềm HADDOCK, cho phép mô phỏng tương tác protein - DNA dựa trên các ràng buộc sinh học và đặc điểm bề mặt tương tác. Các phức hợp protein-DNA thu được sau docking được phân tích và trực quan hóa bằng phần mềm Chimera phiên bản 1.19 [87].

Mức độ tương tác giữa miền AP2 và DNA promoter được đánh giá dựa trên nhiều tiêu chí, bao gồm diện tích bề mặt tiếp xúc, tương tác tĩnh điện, các amino acid và nucleotide tham gia liên kết, cũng như năng lượng liên kết và điểm số docking, từ đó ước lượng độ ổn định và tính đặc hiệu của phức hợp protein - DNA.

Bảng 2.2. Đặc điểm và trình tự của các vùng AP2 của protein GmDREB, vị trí liên kết DNA, vùng khởi động của các gene *NtP5CS*, *NtSODFe* và các motif tác động *cis*

Vùng/miền/ motif	Trình tự	Mô tả
AP2 của protein GmDREB5	YRGVRQRHWGKWVAEIRLPRN RTRLWLGTFTDAEDAAMAYDR EAFKQRGENARLNFPELFFNK	Vùng AP2 của protein DREB5 chứa các vị trí liên kết với promoter
Các vị trí liên kết với DNA của AP2 thuộc GmDREB5	RGRRWKERRWT	Vị trí liên kết với DNA bao gồm 11 amino acid
Promoter của gene <i>NtP5CS</i>	ACCGACGCCGACATGGTTAGA GCCGACAGTGGTTAAGGAA	Trình tự các motif <i>cis</i> -acting của vùng khởi động gene <i>NtP5CS</i>
Promoter của gene <i>NtSODFe</i>	TTGACCGACATGACGTGTTGC CGACAGGTTAAGAGCCGACA AAGAAAAA	Trình tự các motif <i>cis</i> -acting của vùng khởi động gene <i>NtSODFe</i>
AP2 của protein GmDREB7	YRGVRRRDSGKWVCEVREPKN KSRIWLGTFTPTAEMAARAHDV AAIALRGRSACLNFADS	Vùng AP2 của protein DREB5 chứa các vị trí liên kết với promoter
Vị trí liên kết DNA của protein DREB7	RGRRSKERRWT	Vị trí liên kết DNA bao gồm 11 amino acid
Promoter của <i>GmP5CS</i>	TTACCGACAGCCGCCTGGTTAA CGTGTAAGTGGCCGACGAAAA ACATGTGAGCCGCC	Trình tự các motif <i>cis</i> -acting của vùng khởi động gene <i>GmP5CS</i>
DRE/CRT	RCCGAC	Đáp ứng với stress phi sinh học: muối, lạnh, hạn hán
ABRE	ACGTG	Đáp ứng với ABA (ABA liên quan đến stress muối).
GT-1	GAAAAA / TGGTTA	Đáp ứng với stress muối

2.3.5. Các phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu

Các dữ liệu liên quan đến trình tự gene và protein được thu thập từ ngân hàng dữ liệu NCBI, sau đó được xử lý và phân tích bằng các phần mềm tin sinh học như BLAST, BioEdit, MEGA11, MEGA12 và một số công cụ hỗ trợ khác nhằm phục vụ cho việc so sánh trình tự, căn chỉnh đa trình tự và phân tích phát sinh chủng loại.

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.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Các nghiên cứu trước đây đã khẳng định rằng gene thuộc phân họ *DREB*, mã hóa yếu tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF đóng vai trò trung tâm trong mạng lưới điều hòa đáp ứng của thực vật đối với các stress phi sinh học như hạn hán và mặn. Thông qua khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu vào các trình tự *cis*, các protein DREB điều hòa biểu hiện của nhiều gene liên quan đến bảo vệ tế bào và duy trì cân bằng sinh lý dưới điều kiện bất lợi. Do đó, nhóm gene *DREB* thuộc họ gene AP2 được xem là mục tiêu tiềm năng trong các nghiên cứu nhằm cải thiện khả năng chống chịu stress của cây trồng bằng kỹ thuật chuyển gene. Trên cơ sở đó, việc sàng lọc, phân tích và so sánh đặc điểm tiến hóa của các gene thuộc họ AP2 ở cây mô hình *A. thaliana* và cây đậu tương dựa trên dữ liệu trình tự thu thập từ cơ sở dữ liệu GenBank, kết hợp các phương pháp phân tích tiến hóa phân tử bằng công cụ tin sinh học là cần thiết để lựa chọn gene ứng cử viên phục vụ nghiên cứu chức năng gene liên quan đến tính chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học của cây 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, trong đó bao gồm 42 trình tự từ *A. thaliana* và 101 trình tự từ cây đậu tương (PL9). Tập hợp các trình tự này được sử dụng làm cơ sở để xây dựng cây phát sinh chủng loại, nhằm đánh giá mối quan hệ tiến hóa cũng như mức độ đa dạng và mở rộng của họ gene AP2 của hai loài đại diện *A. thaliana* và đậu tương.

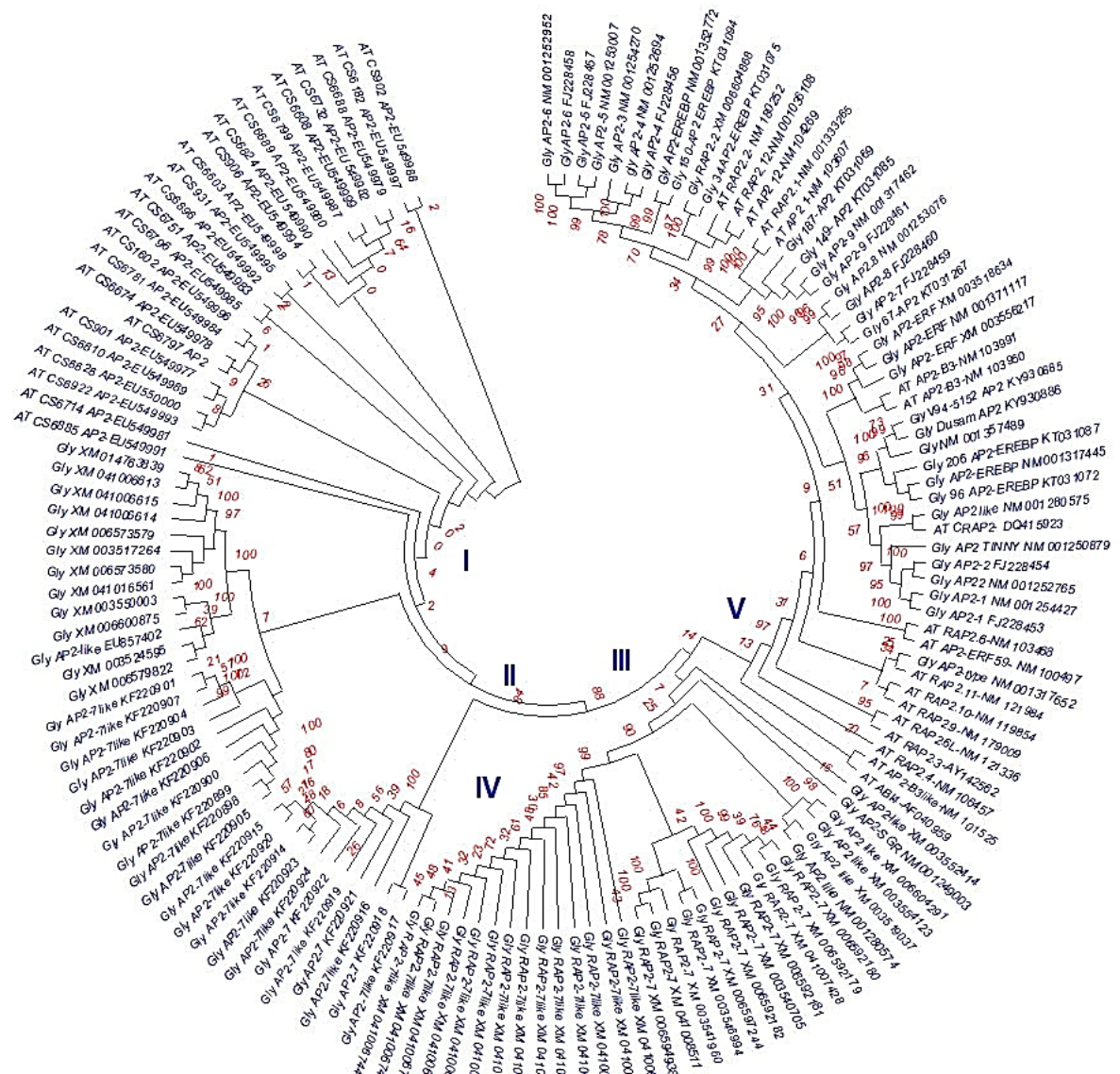
Trong hệ gene của *A. thaliana*, 42 gene AP2 được phân bố trên toàn bộ 5 nhiễm sắc thể (NST 1 - 5) và được phân loại thành 8 nhóm dựa trên phân tích phát sinh chủng loại. Đáng chú ý, NST số 4 chứa số lượng gene AP2 lớn nhất (26 trình tự), gợi ý việc nhân đoạn gene cục bộ hoặc tái tổ hợp có thể đã diễn ra trong quá trình tiến hóa của loài này. Ngược lại, các NST số 2; 3 và 5 chỉ mang số lượng gene AP2 rất hạn chế (mỗi NST gồm 2 trình tự), phản ánh sự phân bố không đồng đều của họ gene AP2 trong hệ gene của *A. thaliana*.

Ở cây đậu tương, 101 gene *AP2* được phân bố trên 17 nhiễm sắc thể (NST 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8 và NST 11-20), cho thấy mức độ mở rộng đáng kể của họ gene *AP2* so với *A. thaliana*. Dựa trên phân tích phát sinh chủng loại kết hợp với đặc điểm trình tự, các gene *AP2* của đậu tương được phân loại thành 16 nhóm khác nhau, bao gồm *AP2-1*, *AP2-2*, *AP2-3*, *AP2-4*, *AP2-5*, *AP2-6*, *AP2-7*, *AP2*, *AP2-like*, *AP2-7-like*, *RAP2*, *RAP2-7*, *RAP2-7-like*, *AP2-EREBP*, *SGR-AP2* và *Lf1-AP2*. Phần lớn các gene trong họ *AP2* của đậu tương tồn tại với số lượng bản sao thấp (1-2 bản sao); tuy nhiên, một số nhóm thể hiện sự mở rộng số lượng bản sao rõ rệt, tiêu biểu là nhóm *AP2-like* với 6 bản sao, tiếp theo là nhóm *AP2* (4 bản sao), các nhóm *RAP2-7* và *AP2-EREBP* (mỗi nhóm gồm 3 bản sao). Sự gia tăng số lượng bản sao ở các nhóm có thể liên quan đến việc nhân đôi toàn bộ hệ gene, là một đặc điểm tiến hóa điển hình đã được ghi nhận trong lịch sử tiến hóa của cây đậu tương.

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.

Nhìn chung, mô hình phân nhóm phát sinh chủng loại với sự tồn tại của các nhóm đơn ngành đặc trưng cho từng loài cùng với nhóm cận đơn ngành chung phản ánh rõ nét lịch sử tiến hóa phân tử phức tạp của họ gene *AP2*. Các kết quả này cho thấy, mặc dù các gene *AP2* được bảo tồn tương đối cao về cấu trúc giữa

A. thaliana và đậu tương nhưng quá trình mở rộng và đa dạng hóa họ gene ở đậu tương đã diễn ra mạnh mẽ hơn. Sự mở rộng này nhiều khả năng đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng thích nghi sinh thái, đặc biệt là cơ chế điều hòa đáp ứng đối với các điều kiện stress phi sinh học như hạn và mặn.



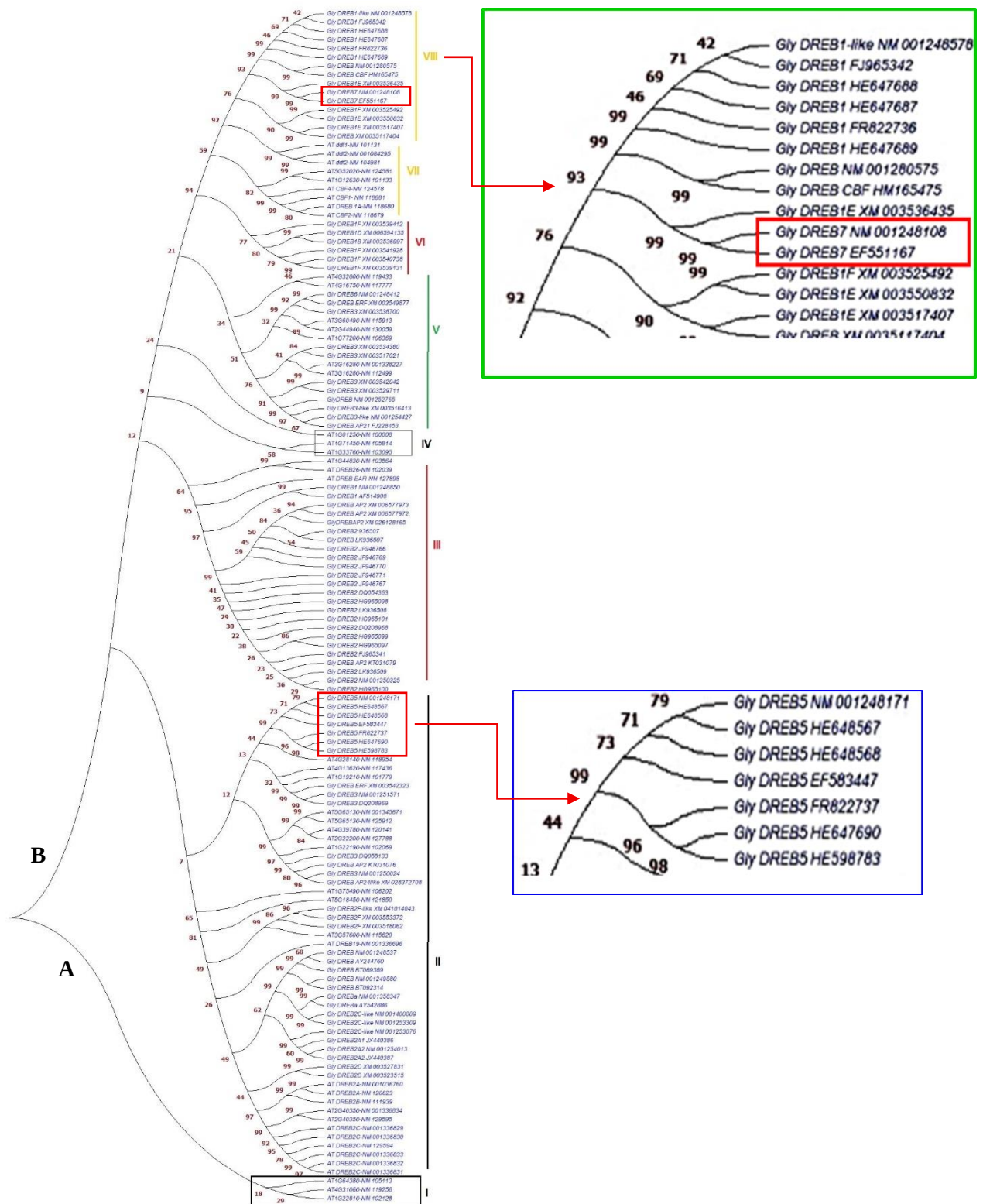
Hình 3.1. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa phân tử của các thành viên của họ gene AP2 ở *A. thaliana* và đậu tương theo phương pháp ML và JTT maxtrix-based model trong MEGA

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 (PL10). Các gene *DREB* của đậu tương phân bố trên 17 nhiễm sắc thể, bao gồm các nhiễm sắc thể từ số 1 - 14; số 17; 19 và 20 cho thấy sự phân bố rộng khắp của phân họ gene này trong toàn bộ hệ gene. Trong số đó, nhiễm sắc thể số 13 chứa số lượng gene *DREB* lớn nhất (5 gene), tiếp theo là nhiễm sắc thể số 6 và 12, mỗi nhiễm sắc thể mang 4 gene. Ngược lại, một số nhiễm sắc thể như 2; 3; 5; 7 và 20 chỉ mang 1 gene *DREB*, phản ánh sự phân bố không đồng đều của phân họ gene này 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). Có sự chênh lệch đáng kể về số lượng gene *DREB* khi so sánh giữa hai loài, cho thấy phân họ gene *DREB* ở đậu tương đã trải qua quá trình mở rộng mạnh mẽ hơn so với *A. thaliana*. Cây phát sinh chủng loại ở Hình 3.2 thể hiện sự hình thành của hai nhánh tiến hóa lớn (ký hiệu là nhánh A và nhánh B), bao gồm 8 nhóm (nhóm I đến nhóm VIII). Nhánh A bao gồm một nhóm đơn ngành duy nhất (nhóm I), chỉ chứa 3 trình tự *DREB* của *A. thaliana*, phản ánh một nhánh tiến hóa đặc thù gắn liền với loài này. Ngược lại, nhánh B bao gồm bảy nhóm còn lại (nhóm II - VIII), thể hiện mức độ đa dạng và mở rộng đáng kể của phân họ gene *DREB*.

Trong nhánh B, bốn nhóm được xác định là các nhóm đơn ngành, bao gồm hai nhóm đặc trưng cho đậu tương (nhóm VI với 6 trình tự và nhóm VIII với 15 trình tự) và hai nhóm đặc trưng cho *A. thaliana* (nhóm IV với 3 trình tự và nhóm VII với 9 trình tự).



Hình 3.2. Cây phát sinh và quan hệ tiến hóa phân tử của các thành viên của phân họ gene *DREB* ở *A. thaliana* và đậu tương theo phương pháp ML và JTT maxtrix-based model trong MEGA.

Bên cạnh đó, ba nhóm còn lại (nhóm II, III và V) được xác định là các nhóm cận đơn ngành, chứa các trình tự *DREB* của cả hai loài. Các nhóm này lần lượt bao gồm 55; 27 và 17 trình tự. Sự chiếm ưu thế của các nhóm cận đơn ngành phản ánh mối quan hệ tiến hóa gần gũi cũng như mức độ bảo tồn cao của phân họ gene *DREB* giữa loài *A. thaliana* và đậu tương. Đồng thời, sự tồn tại của các nhóm đơn ngành đặc trưng cho từng loài cho thấy quá trình phân hóa tiến hóa của phân họ gene *DREB* vẫn đang tiếp diễn, góp phần tạo nên sự đa dạng về cấu trúc và chức năng của các gene *DREB*. Những khác biệt này nhiều khả năng đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa đáp ứng của thực vật đối với các điều kiện stress môi trường khác nhau, đặc biệt là stress mặn và hạn.

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

Miền AP2 là vùng trình tự bảo tồn cao trong protein DREB, có chiều dài khoảng 58 - 59 amino acid, đóng vai trò trung tâm trong việc nhận diện và liên kết đặc hiệu với các yếu tố *cis* như DRE/CRT hoặc GCC- box nằm trong vùng promoter của các gene mục tiêu. Thông qua miền AP2, các protein DREB hoạt động như nhân tố phiên mã tác động trans, tham gia điều hòa biểu hiện của nhiều gene liên quan đến đáp ứng với các dạng stress phi sinh học, bao gồm hạn hán, mặn và nhiệt độ. Về mặt cấu trúc, miền AP2 chứa một tập hợp các amino acid chức năng tham gia trực tiếp vào quá trình tương tác với mạch DNA theo chiều 3'→5', hình thành nên vùng nhận biết đặc trưng. Sự gắn kết này góp phần kích hoạt hoặc tăng cường quá trình phiên mã của các gene mục tiêu, từ đó nâng cao khả năng thích nghi của thực vật trước các điều kiện môi trường bất lợi, đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây [94].

Kết quả so sánh trình tự miền AP2 của các protein DREB ở *A. thaliana* và đậu tương (Bảng 3.1) cho thấy, ở cả hai loài, miền AP2 đều chứa 11 amino acid tham gia trực tiếp vào liên kết với DNA. Tuy nhiên, sự khác biệt trong thành phần và vị trí sắp xếp của các amino acid này đã hình thành 12 dạng motif liên kết DNA khác nhau.

Bảng 3.1. Các dạng amino acid của miền AP2 trong protein DREB liên kết với trình tự *cis* của promoter

Dạng amino acid	Gene		Dạng amino acid	Gene	
	Đậu tương	<i>A. thaliana</i>		Đậu tương	<i>A. thaliana</i>
RGRRWKERRWT	<i>DREB</i> , <i>DREB1</i> , <i>DREB2A</i> , <i>DREB2D</i> , <i>DREB3</i> , <i>DREB3-like</i> , <i>DREB5</i> , <i>DREB6</i>	<i>DREB2C</i> , <i>DREB2B</i> , <i>AT 1G</i> , <i>AT 5G</i> , <i>Ddf2</i>	KGRRNKERRWT	<i>DREB1D</i> , <i>DREB1B</i>	
RGRRSKERRWT	<i>DREB1</i> , <i>DREB-like</i> , <i>DREB7</i>	<i>DREB1A</i> , <i>CBF1</i> , <i>CBF2</i> , <i>CBF4</i>	KGRRWKERRWS	<i>DREB3</i>	<i>AT 1G</i> , <i>DREB 26</i>
RGRRWKERRWS	<i>DREB2</i> , <i>DREB2F</i>		KGRRWKERRWT		<i>AT 1G</i>
RGRRSKERRWS		<i>AT 4G</i>	TGRRWKERRWS		<i>AT 5G</i>
RGRRNKERRWT	<i>DREB1F</i> , <i>DREB1E</i>		TGRRWKERRWT		<i>AT 2G</i>
RGRRRKERRWT	<i>DREB1F</i>		HGRRWKERRWS		<i>AT 1G</i>

Trong số đó, hai motif RGRRWKERRWT và RGRRSKERRWT, xuất hiện phổ biến ở cả hai loài, phản ánh mức độ bảo tồn cao của cơ chế nhận diện DNA trong phân họ DREB. Đáng chú ý, một số motif đặc trưng như KGRRWKERRWT, TGRRWKERRWS, TGRRWKERRWT và HGRRWKERRWS chỉ được ghi nhận ở *A. thaliana*, trong khi các motif KGRRNKERRWT, RGRRNKERRWT,

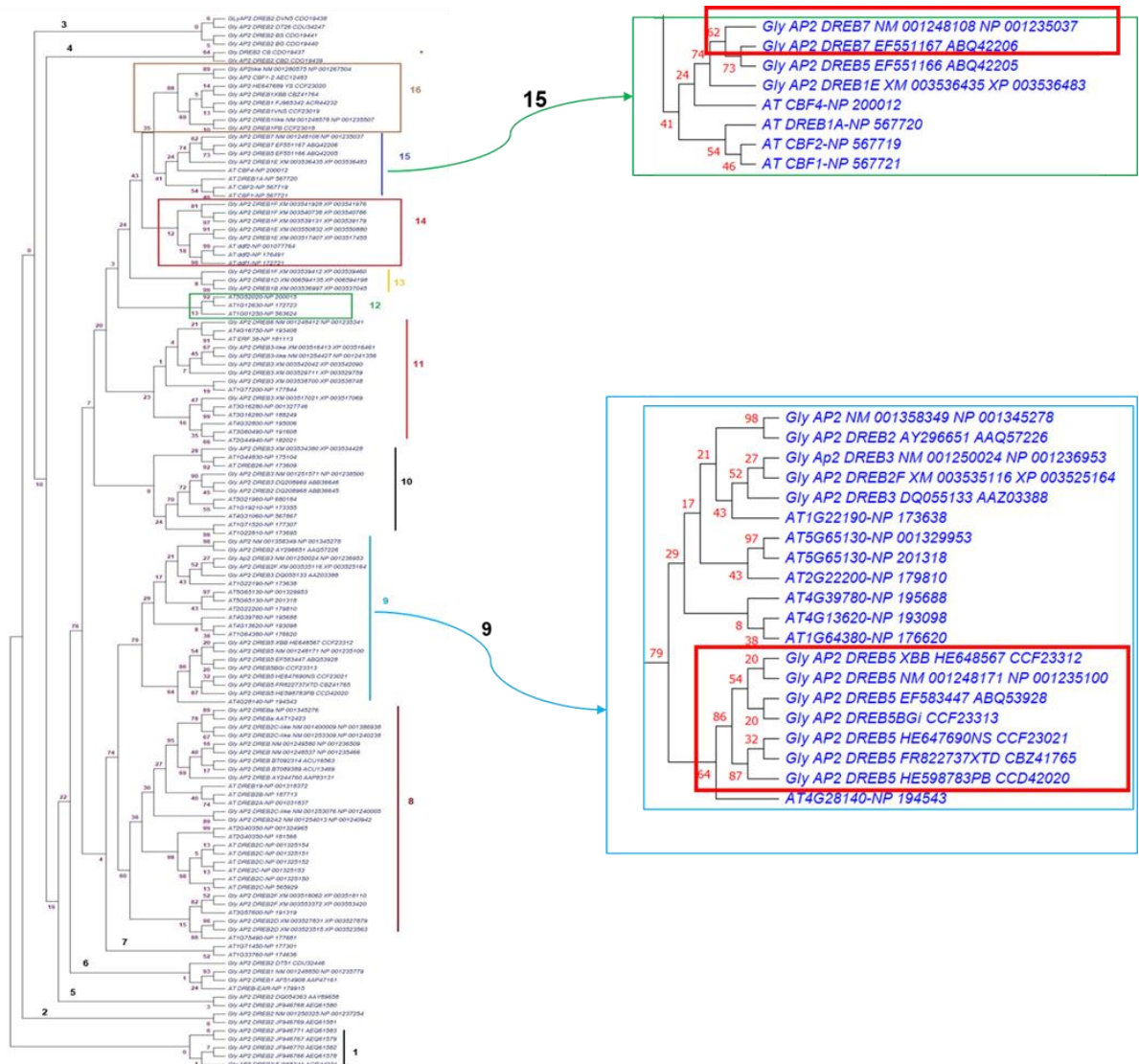
RGRRRKERRWT và RGRRGKERRWT lại chỉ xuất hiện ở đậu tương mà không được phát hiện ở *A. thaliana*. Những khác biệt này cho thấy quá trình đa dạng hóa trình tự miền AP2 đã diễn ra theo hướng đặc thù ở từng loài trong quá trình tiến hóa.

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.

Sự tập trung phần lớn các trình tự miền AP2 trong các nhóm cận đơn ngành phản ánh mức độ bảo tồn cao của miền này trong suốt quá trình tiến hóa. Kết quả cho thấy, miền AP2 giữ vai trò then chốt trong việc duy trì chức năng điều hòa phiên mã của các protein DREB, đặc biệt trong các đáp ứng của thực vật đối với stress phi sinh học. Đồng thời, sự tồn tại song song của các nhóm đơn ngành cùng với các motif liên kết DNA mang tính đặc trưng theo loài gợi ý rằng, bên cạnh tính bảo tồn về cấu trúc và chức năng, miền AP2 vẫn tiếp tục trải qua quá trình phân hóa tiến hóa nhằm đáp ứng các yêu cầu thích nghi sinh thái đặc thù của *A. thaliana* và đậu tương.

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại ở cấp độ họ gene AP2, phân họ gene DREB và miền AP2 trong protein DREB cho thấy sự khác biệt rõ rệt về quy mô, mức độ đa dạng và mô hình tiến hóa giữa *A. thaliana* và đậu tương. Ở *A. thaliana*, chỉ ghi nhận 42 gene AP2 phân bố trên 5 nhiễm sắc thể, trong khi hệ gene đậu tương chứa tới 101 gene AP2 phân bố trên 17 nhiễm sắc thể. Sự mở rộng đáng kể của họ gene AP2 ở đậu tương phản ánh rõ tác động của việc nhân đôi toàn bộ hệ gene đã xảy ra nhiều lần trong lịch sử tiến hóa của loài này, qua

đó góp phần làm gia tăng tính đa dạng di truyền và tiềm năng thích nghi với các điều kiện môi trường bất lợi.



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

3.1.4. Thảo luận kết quả

Các kết quả thu được trong nghiên cứu phù hợp với những báo cáo trước đây về lịch sử tiến hóa của hệ gene đậu tương, trong đó các sự kiện nhân đôi toàn bộ hệ gene (WGD) được xác định là động lực chủ yếu thúc đẩy sự gia tăng số lượng gene

cũng như đa dạng chức năng, đặc biệt đối với các họ gene tham gia điều hòa phiên mã và đáp ứng với stress môi trường [14], [96].

Tuy nhiên, điểm mới của nghiên cứu so với các công bố trước nằm ở việc làm sáng tỏ cấu trúc phát sinh chủng loại một cách hệ thống và chi tiết của họ gene *AP2* thông qua so sánh giữa một loài mô hình *A. thaliana* và một cây trồng có giá trị kinh tế cao. Qua đó, nghiên cứu không chỉ cho thấy sự mở rộng về mặt số lượng gene mà còn làm rõ xu hướng phân hóa tiến hóa theo hướng đặc thù loài.

Cây phát sinh chủng loại của họ gene *AP2* cho thấy sự tồn tại của ba nhóm đơn ngành đặc trưng cho đậu tương, phản ánh quá trình phân hóa tiến hóa độc lập và thích nghi sau quá trình nhân đôi gene. Ngược lại, việc phát hiện một nhóm đơn ngành chỉ xuất hiện ở *A. thaliana* cho thấy xu hướng đặc thù tiến hóa của loài mô hình này, có thể liên quan đến các chức năng sinh lý hoặc cơ chế điều hòa phiên mã riêng biệt trong điều kiện sinh trưởng tự nhiên của *A. thaliana*. Bên cạnh đó, sự hiện diện của các nhóm cận đơn ngành chứa trình tự của cả hai loài gợi ý rằng một số phân nhóm *AP2* cổ đã được bảo tồn mạnh mẽ trong quá trình tiến hóa, nhiều khả năng do đảm nhiệm vai trò thiết yếu trong mạng lưới điều hòa biểu hiện gene của thực vật có hoa.

Ở cấp độ phân họ, các phân tích đối với *DREB* và miền *AP2* chức năng cho thấy sự bảo tồn cao về cấu trúc và các motif liên kết DNA, đồng thời vẫn tồn tại các biến đổi mang tính đặc trưng theo loài. Điều này cho thấy, mặc dù chức năng cốt lõi của protein *DREB*, đặc biệt là khả năng nhận diện các yếu tố *cis* liên quan đến stress, được duy trì trong quá trình tiến hóa, nhưng các biến đổi nhỏ trong cấu trúc miền *AP2* có thể góp phần điều chỉnh tính đặc hiệu và cường độ đáp ứng stress ở từng loài. So với các nghiên cứu trước đây vốn chủ yếu tập trung vào việc mô tả trình tự hoặc chức năng riêng lẻ của một số gene *DREB*, luận án đã cung cấp cái nhìn tổng thể hơn về mối liên hệ giữa tiến hóa cấu trúc và tiềm năng chức năng của phân 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.

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại cho thấy các thành viên của phân họ gene *DREB* được phân chia thành tám nhóm tiến hóa riêng biệt (I - VIII), trong đó phần lớn các nhánh chính có giá trị bootstrap cao, dao động chủ yếu từ 80 - 99%, phản ánh độ tin cậy và tính ổn định của sự phân nhóm (Hình 3.2). Gene *GmDREB5* được xác định thuộc nhóm II, cùng một số gene *DREB* của đậu tương cũng như các gene tương đồng ở *A. thaliana*. Nhánh chứa *GmDREB5* có giá trị bootstrap cao, cho thấy mối quan hệ tiến hóa gần gũi và mức độ bảo tồn trình tự giữa các gene trong cùng phân nhóm. Ngược lại, gene *GmDREB7* nằm trong nhóm VIII và tách biệt rõ rệt với *GmDREB5* cũng như các nhóm *DREB* khác. Nhóm VIII chủ yếu bao gồm các gene *DREB* của đậu tương có mức độ tương đồng trình tự cao, với giá trị bootstrap xấp xỉ 99%, phản ánh tính bảo tồn tiến hóa cao của nhánh này. Gene *GmDREB5* và *GmDREB7* thuộc hai nhánh tiến hóa khác nhau, gợi ý khả năng đảm nhiệm các vai trò chức năng riêng biệt trong cơ chế đáp ứng stress ở cây đậu tương. Sự khác biệt về vị trí tiến hóa của hai gene là cơ sở khoa học quan trọng cho việc lựa chọn *GmDREB5* và *GmDREB7* làm đối tượng nghiên cứu chức năng chuyên sâu, đồng thời định hướng các nghiên cứu ứng dụng nhằm cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn của cây đậu tương thông qua công nghệ chuyển gene.

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

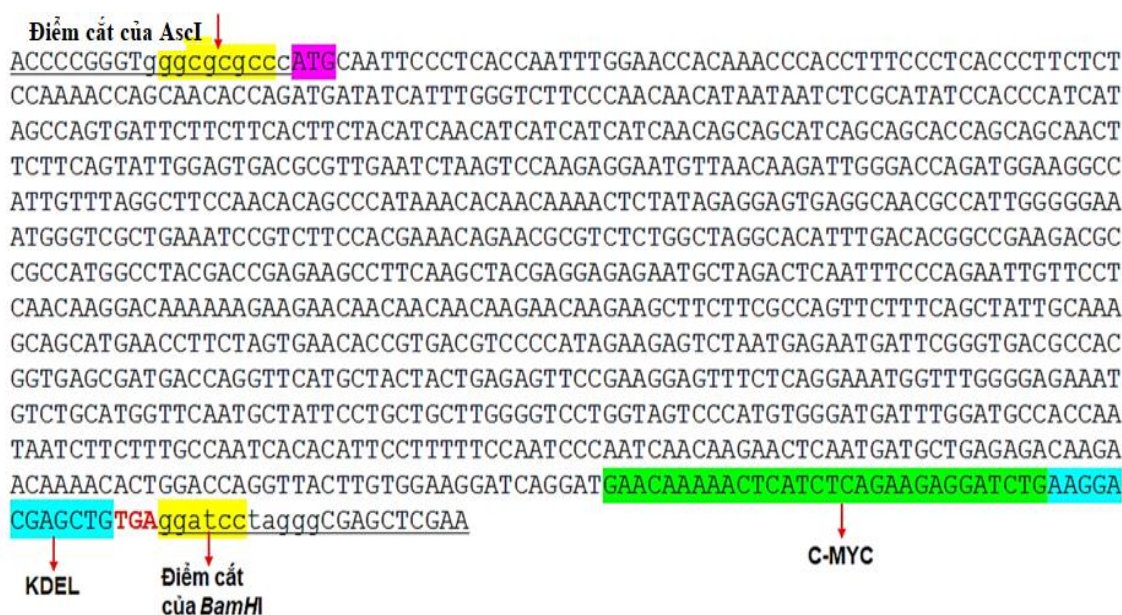
Thông qua phân tích tiến hóa phân tử bằng các công cụ tin sinh học, gene *GmDREB5* đã được lựa chọn như một gene ứng cử viên tiềm năng trong việc cải thiện khả năng chống chịu các stress phi sinh học ở cây đậu tương. Mặc dù nhiều nghiên cứu trước đây đã bước đầu làm sáng tỏ vai trò của các gene thuộc phân họ *DREB* ở đậu tương, tuy nhiên chức năng sinh học cụ thể của một số gene, trong đó có *GmDREB5*, liên quan đến đáp ứng với các điều kiện bất lợi như hạn và mặn vẫn chưa được hiểu rõ và cần tiếp tục làm sáng tỏ. Chuyển gene thông

qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được xem là một công cụ hiệu quả nhằm phân tích chức năng gene và khai thác tiềm năng của các gene điều hòa phiên mã trong việc nâng cao khả năng chống chịu stress phi sinh học của cây trồng, góp phần thích ứng với biến đổi khí hậu. Trong nghiên cứu này, quá trình chuyển gene được tiến hành theo các bước chính bao gồm: Thiết kế cấu trúc gene, xây dựng vector biểu hiện, chuyển gene gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*, xác định sự có mặt của gene chuyển trong cây nhận và phân tích mức độ biểu hiện của gene. Thông qua hệ thống chuyển gene nhờ *A. tumefaciens*, chức năng của gene *GmDREB5* trong điều hòa đáp ứng với stress phi sinh học có thể được đánh giá một cách toàn diện và có hệ thống.

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

3.2.1.1. Thiết kế gene *GmDREB5*

Gene *GmDREB5* được thiết kế dựa trên trình tự gene *DREB5* của đậu tương (mã số FR822737.1) trên cơ sở dữ liệu GenBank được thể hiện ở hình 3.4.

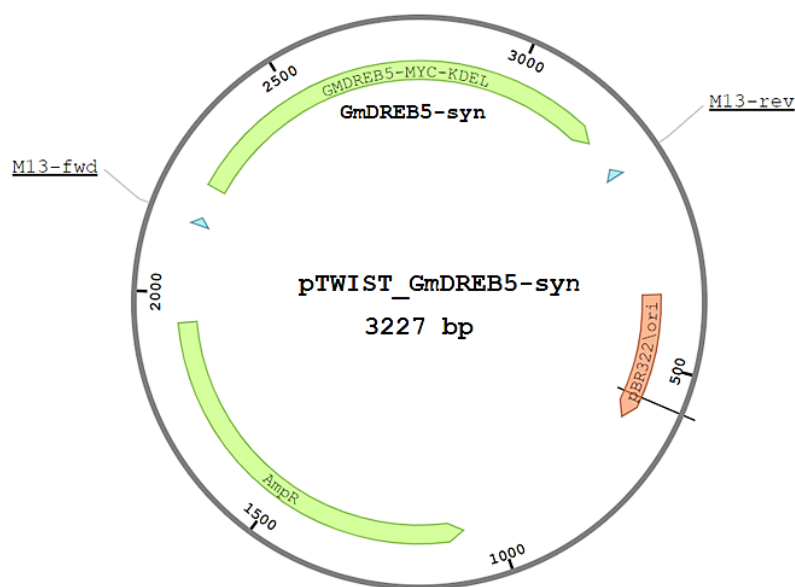


Hình 3.4. Trình tự nucleotide của gene *GmDREB5* chứa điểm cắt của enzyme *AsclI* và *BamHI*; trình tự mã hoá c-MYC và KDEL.

Trên Hình 3.4, cấu trúc gene *GmDREB5* được xây dựng bao gồm vùng mã hóa của *DREB5*, đồng thời được tối ưu hóa và bổ sung các yếu tố chức năng nhằm phục vụ cho các phân tích biểu hiện và định vị protein tái tổ hợp. Cụ thể, trình tự mã hóa

peptide c-MYC được gắn vào đầu C của protein, tạo thể kháng nguyên cho phép phát hiện protein tái tổ hợp thông qua phương pháp Western blot sử dụng kháng thể đặc hiệu. Bên cạnh đó, trình tự mã hóa tín hiệu dẫn KDEL được tích hợp vào cấu trúc gene nhằm định vị protein trong lưới nội chất sau khi được tổng hợp, qua đó hỗ trợ các nghiên cứu về vị trí và chức năng protein trong tế bào. Để tạo thuận lợi cho quá trình nhân dòng và lắp ráp vector biểu hiện, các vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn được bổ sung ở hai đầu của gene. Một đoạn trình tự dài 19 bp chứa vị trí cắt enzyme *AscI* được gắn vào đầu 5', trong khi một đoạn trình tự dài 21 bp chứa vị trí cắt của enzyme *BamHI* được thêm vào đầu 3' của gene. Sau khi tích hợp đầy đủ các thành phần trên, tổng chiều dài của gene *GmDREB5* đạt 1006 nucleotide.

Sau khi hoàn tất quá trình thiết kế, gene *GmDREB5* được gắn vào vector nhân dòng pTwist, tạo thành vector tái tổ hợp *pTWIST_GmDREB5-syn* (Hình 3.5).



Hình 3.5. Sơ đồ vector tái tổ hợp *pTWIST_GmDREB5-syn*.

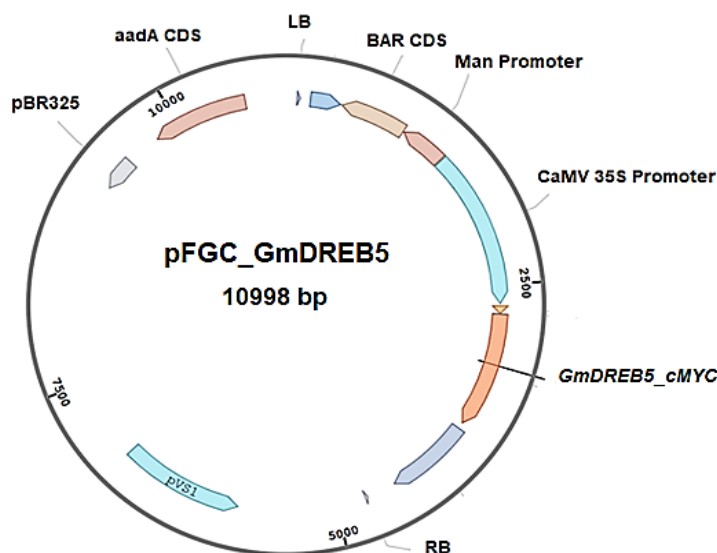
GmDREB5: vị trí của gene *GmDREB5* trên vector pTWIST; M13-fwd và M13-rev: vị trí tiếp hợp của cặp mồi M13-f/M13/R; *AmpR*: vùng plasmid chứa gene kháng kháng sinh ampicillin.

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. Các dòng khuẩn lạc dương tính mang plasmid chứa gene *GmDREB5* 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, qua đó tạo nguồn vật liệu DNA có độ tinh khiết cao, phục vụ cho các bước xây dựng vector biểu hiện gene *GmDREB5* trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.1.2. Thiết kế vector biểu hiện gene *GmDREB5*

Để xây dựng vector biểu hiện gene *GmDREB5*, plasmid *pTWIST_GmDREB5-syn* được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn *AscI* và *BamHI* để thu nhận đoạn gene *GmDREB5*. Song song với đó, vector biểu hiện pFGC5941 được cắt bằng cùng cặp enzyme nhằm loại bỏ đoạn “CHSA intron”, từ đó tạo vị trí tiếp nhận phù hợp cho việc lắp ráp gene *GmDREB5* vào vector. 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).



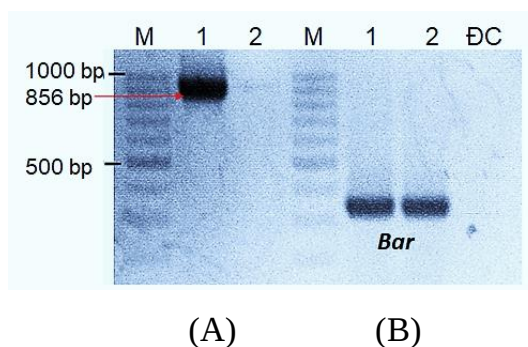
Hình 3.6. Cấu trúc của vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5*.

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.

Vector này chứa đầy đủ các yếu tố điều hòa cần thiết cho sự biểu hiện gene trong tế bào thực vật, đồng thời mang gene chọn lọc *Bar*, cho phép tuyển chọn hiệu quả các dòng thực vật chuyển gene trong các thí nghiệm tiếp theo.

Để xác định các dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp *pFGC_GmDREB5*, phản ứng colony-PCR được tiến hành với hai cặp mồi 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.

Trên Hình 3.7B, cả plasmid *pFGC_GmDREB5* và vector *pFGC5941* đều cho băng DNA có kích thước khoảng 300 bp, tương ứng với gene chọn lọc *Bar*. Plasmid tái tổ hợp *pFGC_GmDREB5* được tách chiết từ khuẩn lạc dương tính với colony-PCR. Sau khi tinh sạch, plasmid *pFGC-GmDREB5* được đem giải trình tự bằng mồi MYC-KDEL-R. Kết quả trình tự nucleotide ở phụ lục 11 (PL11) đã cho thấy gene *GmDREB5* đã được ghép nối thành công vào vector biểu hiện *pFGC5941* tạo thành vector tái tổ hợp *pFGC_GmDREB5*. Những kết quả này khẳng định việc thiết kế gene *GmDREB5* và xây dựng vector biểu hiện *pFGC_GmDREB5* đã được thực hiện thành công, tạo cơ sở cho các thí nghiệm chuyển gene và đánh giá chức năng của gene *GmDREB5* trong các nghiên cứu tiếp theo.



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 mồi *GmDREB5*-F/MYC-KDEL-R.

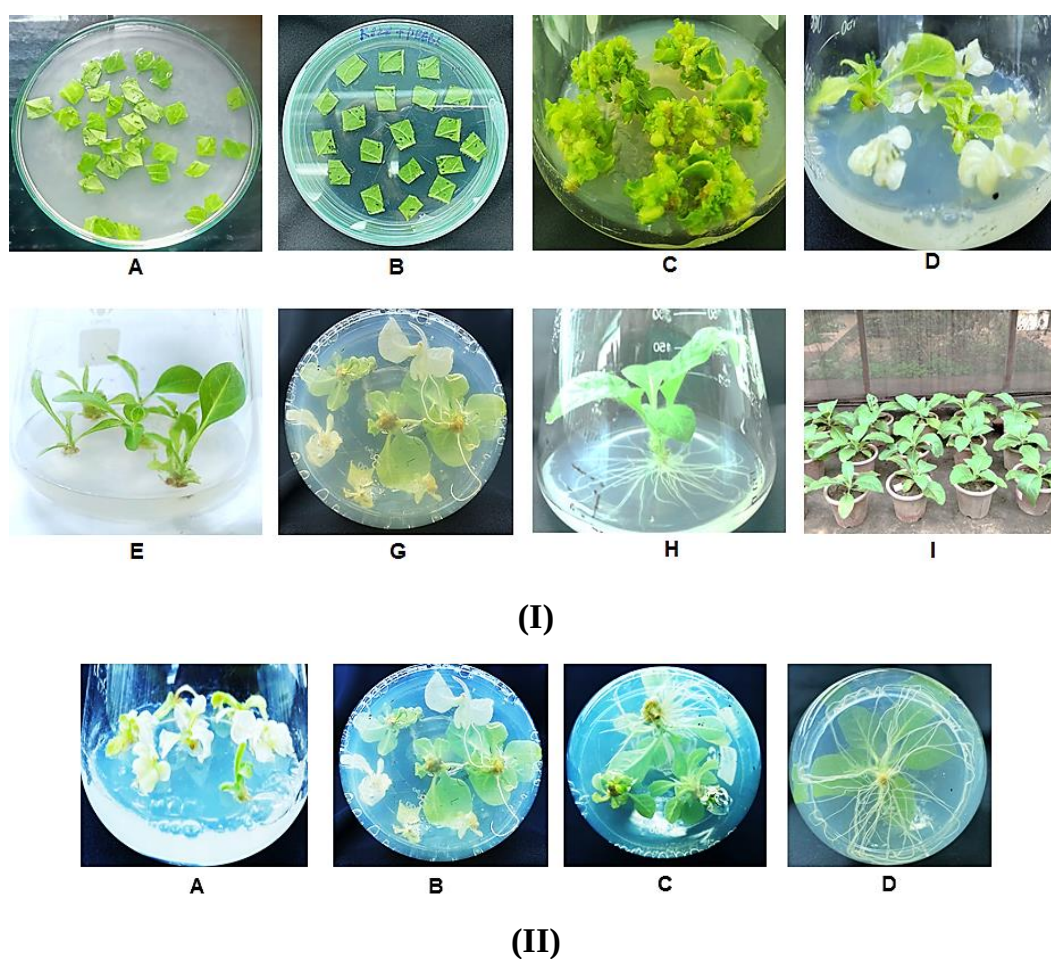
(B) Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi *BarR3*-F/*BarR1*-R.

M: thang DNA chuẩn; Làn 1: khuẩn lạc *A. tumefaciens* tái tổ hợp đã chọn lọc; Làn 2: plasmid *pFGC5941*; ĐC: 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*

3.2.2.1. Biến nạp cấu trúc mang gene *GmDREB5* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*

Quá trình biến nạp cấu trúc biểu hiện *pFGC_GmDREB5* vào cây thuốc lá được thực hiện thông qua hệ thống chuyển gene *A. tumefaciens* và được lặp lại trong ba đợt thí nghiệm độc lập nhằm đánh giá khả năng tái sinh mô cũng như hiệu quả chọn lọc các dòng cây chuyển gene. Kết quả chi tiết của từng đợt biến nạp được tổng hợp và trình bày trong Hình 3.8 và Bảng 3.2.



Hình 3.8. Hình ảnh biến nạp di truyền, tái sinh, chọn lọc *in vitro* và tạo cây thuốc lá chuyển gene.

(I) Hình ảnh các giai đoạn biến nạp vector *pFGC_GmDREB5* vào mô lá thuốc lá. A: Mảnh lá ngâm trong chủng *A. tumefaciens* AGL1 tái tổ hợp mang vector biểu hiện gene *pFGC_GmDREB5*; B: Đồng nuôi cấy các mảnh lá thuốc lá nhiễm khuẩn;

C: Mảnh lá phát sinh chồi; D: Chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc với glufosinate-ammonium; E: Rễ hình thành từ chồi tái sinh trên môi trường ra rễ bổ sung chất chọn lọc glufosinate-ammonium; G: Sự phát triển của rễ từ chồi tái sinh; H: Cây con riêng lẻ đã bén rễ tốt trên môi trường ra rễ không có chất chọn lọc glufosinate-ammonium; I: Sự thích nghi của cây thuốc lá chuyển gene trong điều kiện nhà lưới. (II) Hình ảnh quá trình chọn lọc *in vitro* các cây thuốc lá chuyển gene pFGC_GmDREB5 bằng chất chọn lọc glufosinate-ammonium. (A) Chọn lọc các chồi đã chuyển gene; (B) Sự hình thành rễ từ các chồi có khả năng kháng glufosinate ammonium; (C) Các chồi sống sót và sự phát triển của rễ trong môi trường cảm ứng tạo rễ; (D) Cây thuốc lá chuyển gene trong ống nghiệm phát triển tốt.

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 cây và tái sinh hình thành chồi, 70 mẫu mô vẫn duy trì khả năng sống, tương ứng với tỷ lệ sống trung bình đạt khoảng 77,8%. Từ các mẫu mô này, 162 cụm chồi đã được hình thành trong quá trình tái sinh *in vitro*.

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

Ghi chú: * ĐC1: mảnh lá không biến nạp tái sinh trên môi trường có chất chọn lọc glufosinate-ammonium; * ĐC0: mảnh lá không biến nạp tái sinh trên môi trường không có chất chọn lọc.

Tuy nhiên, khi các chồi được chuyển sang môi trường chọn lọc, số lượng cá thể sống sót giảm đáng kể. Cụ thể, chỉ có 52 chồi vượt qua giai đoạn chọn lọc ban đầu, chiếm khoảng 32,1% so với tổng số chồi được tái sinh, phản ánh tác động rõ rệt của áp lực chọn lọc và cho thấy không phải toàn bộ chồi tái sinh đều mang cấu trúc chuyển gene. Trong số các chồi còn sống sau chọn lọc, 35 chồi tiếp tục ra rễ trên môi trường chọn lọc, tương ứng với khoảng 67,3% số chồi sống sót. Kết thúc quy trình tái sinh, 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.

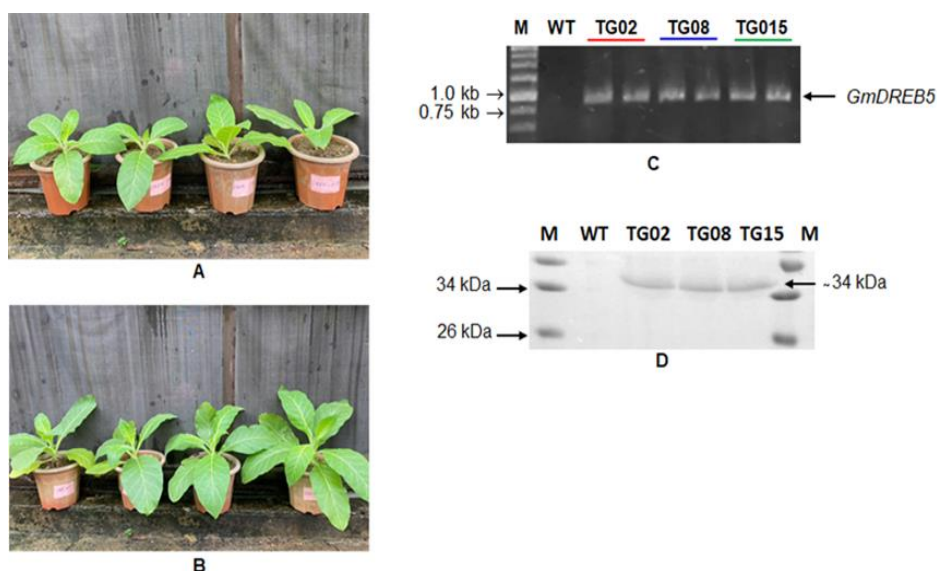
Sự sai khác về số lượng cây tái sinh thu được giữa các lần thí nghiệm (lần lượt là 7; 6 và 10 cây) cho thấy hiệu quả của quá trình biến nạp và tái sinh có thể chịu ảnh hưởng bởi trạng thái sinh lý của mẫu mô cũng như các yếu tố kỹ thuật phát sinh trong từng đợt thí nghiệm riêng biệt. Những biến động này phản ánh tính nhạy cảm của hệ thống chuyển gene đối với điều kiện thực nghiệm.

Kết quả thu được ở các nghiệm thức đối chứng phù hợp với dự kiến ban đầu. Ở đối chứng âm (ĐC1, không lây nhiễm *Agrobacterium*), toàn bộ 30 mẫu mô không sống sót và không hình thành chồi khi được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, cho thấy áp lực chọn lọc được thiết lập là đủ mạnh để loại bỏ hoàn toàn các mẫu không mang gene chọn lọc. Ngược lại, ở đối chứng không chọn lọc (ĐC0), 22 mẫu mô vẫn sống sót và tạo ra 45 cụm chồi, với số lượng chồi ra rễ và cây con thu được cao hơn rõ rệt so với lô biến nạp.

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. Mỗi cây TG0 được cắt thành 3 - 4 đoạn thân chứa các đốt, sau đó được tái sinh thành các cây riêng lẻ. Các cây có nguồn gốc từ một cây TG0 duy nhất được gọi chung là dòng chuyển gene trong thế hệ TG0. Do đó, 18 dòng TG0 đã được thiết lập, được kí hiệu là TG01, TG02, TG05, TG06, TG08, TG09, TG10, TG011, TG013, TG015, TG016, TG018, TG020, TG022, TG024, TG025, TG027 và TG028 (Phụ lục 12). Hai cây từ mỗi dòng chuyển gene được chuyển sang giá thể để tiếp tục phát triển trong nhà lưới. Trong số 18 dòng TG0, 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.

3.2.2.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp *GmDREB5* ở cây thuốc lá chuyển gene thể hệ TG0

Ba dòng thuốc lá chuyển gene thể hệ TG0 (TG02, TG08 và TG015) cùng cây WT (cây đối chứng không chuyển gene) được trồng trong điều kiện nhà lưới và phân tích ở mức độ phân tử nhằm đánh giá sự phiên mã của gene *GmDREB5*. Trước tiên, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện của gene chuyển ở mức độ phiên mã. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR (Hình 3.9C) cho thấy cả ba dòng chuyển gene đều xuất hiện băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 0,75 kb tương ứng với gene *GmDREB5*, trong khi mẫu WT không quan sát thấy băng DNA này. Kết quả này cho thấy gene *GmDREB5* hiện diện và được biểu hiện ở mức phiên mã trong các dòng thuốc lá chuyển gene được khảo sát.



Hình 3.9. Các dòng chuyển gene *GmDREB5* và cây WT (Wild Type) trong điều kiện không có stress và stress muối, cùng với kết quả phân tích RT-PCR và Western blot.

(A) Nhóm đối chứng được tưới 50 mL H₂O cho mỗi lần. (B) Nhóm thực nghiệm được tưới 50 mL NaCl 250 mM cho mỗi lần. Đối với phân tích biểu hiện gene, các mẫu lá từ các dòng WT và chuyển gene được thu thập sau lần xử lý thứ ba (vào ngày thứ 10). (C) Phân tích điện di gel các sản phẩm RT-PCR. M: thang DNA; WT: cây thuốc lá không chuyển gene; TG02, TG08, TG015: các dòng thuốc lá chuyển gene thể hệ TG0. (D) Phát hiện protein tái tổ hợp DREB5 trong ba dòng thuốc lá chuyển gene (TG02, TG08 và TG015) bằng kết quả phân tích Western blot.

Để đánh giá khả năng biểu hiện của gene *GmDREB5* ở mức dịch mã, phân tích Western blot được tiến hành. Trong cấu trúc biểu hiện, gene *GmDREB5*

được gắn thêm trình tự mã hóa peptide c-Myc ở đầu 3', tạo đuôi nhận diện ở đầu C của protein tái tổ hợp. Nhờ đó, protein GmDREB5 sau khi được dịch mã có thể được phát hiện đặc hiệu thông qua kháng thể kháng c-Myc trong phản ứng Western blot. Kết quả Western blot (Hình 3.9D) cho thấy sự xuất hiện của băng protein có khối lượng phân tử xấp xỉ 34 kDa ở cả ba dòng thuốc lá chuyển gene TG02, TG08 và TG015, trong khi không phát hiện băng protein tương ứng ở cây WT. Kích thước băng protein quan sát được phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của protein GmDREB5 mang đuôi c-Myc, qua đó khẳng định protein tái tổ hợp GmDREB5 đã được biểu hiện thành công trong các dòng thuốc lá chuyển gene thông qua phản ứng miễn dịch đặc hiệu.

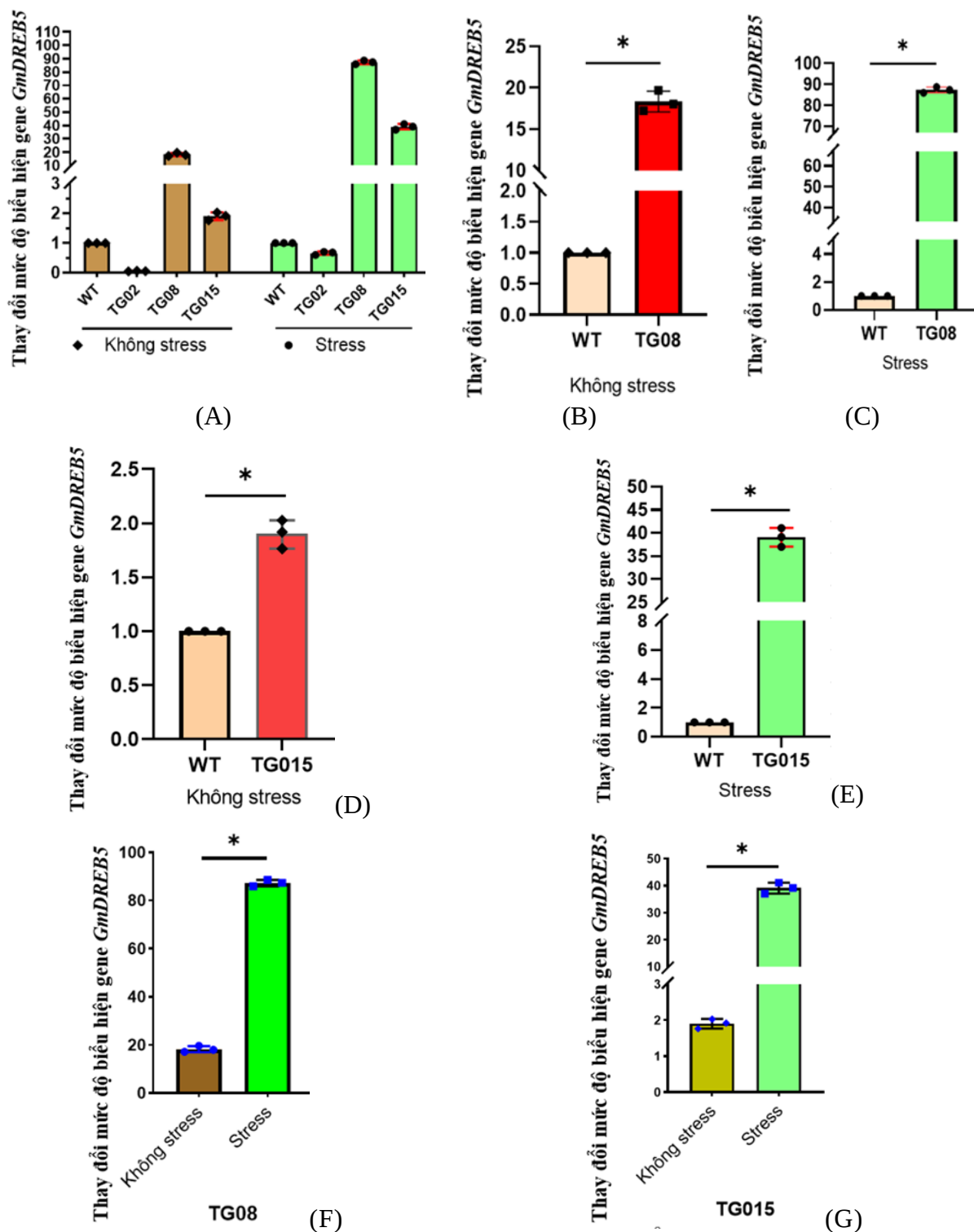
Bên cạnh các phân tích ở mức độ phân tử, các dòng thuốc lá chuyển gene TG02, TG08 và TG015 cùng với cây WT, được sử dụng để đánh giá phản ứng sinh trưởng trong điều kiện stress mặn. Thí nghiệm được bố trí với hai nghiệm thức: Nghiệm thức đối chứng được tưới 50 mL nước cất (Hình 3.9A) và nghiệm thức xử lý stress mặn được tưới 50 mL dung dịch NaCl 250 mM (Hình 3.9B), với chu kỳ tưới 3 ngày/lần. Sau 10 ngày xử lý, các dòng chuyển gene cho thấy khả năng sinh trưởng vượt trội so với cây WT trong điều kiện mặn, phản ánh xu hướng đáp ứng stress tích cực ở các cây biểu hiện gene *GmDREB5*.

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 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 mặn và chịu hạn 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

Mẫu lá của các cây ở cả hai lô thí nghiệm được thu thập để tách RNA tổng số, sau đó được sử dụng làm khuôn tổng hợp cDNA nhằm phục vụ cho phân tích biểu hiện gene bằng kỹ thuật qRT-PCR. Kết quả đánh giá mức độ phiên mã của gene chuyển *GmDREB5* ở các dòng thuốc lá chuyển gene và cây WT, trong điều kiện bình thường và dưới tác động của stress mặn, được trình bày trong Hình 3.10.



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.

(A) Biểu đồ thể hiện mức độ phiên mã của các dòng chuyển gene so với cây WT trong điều kiện không xử lý stress và xử lý stress mặn ($p < 0,05$); (B, C) So sánh mức độ phiên mã của dòng chuyển gene TG08 với cây WT trong hai điều kiện

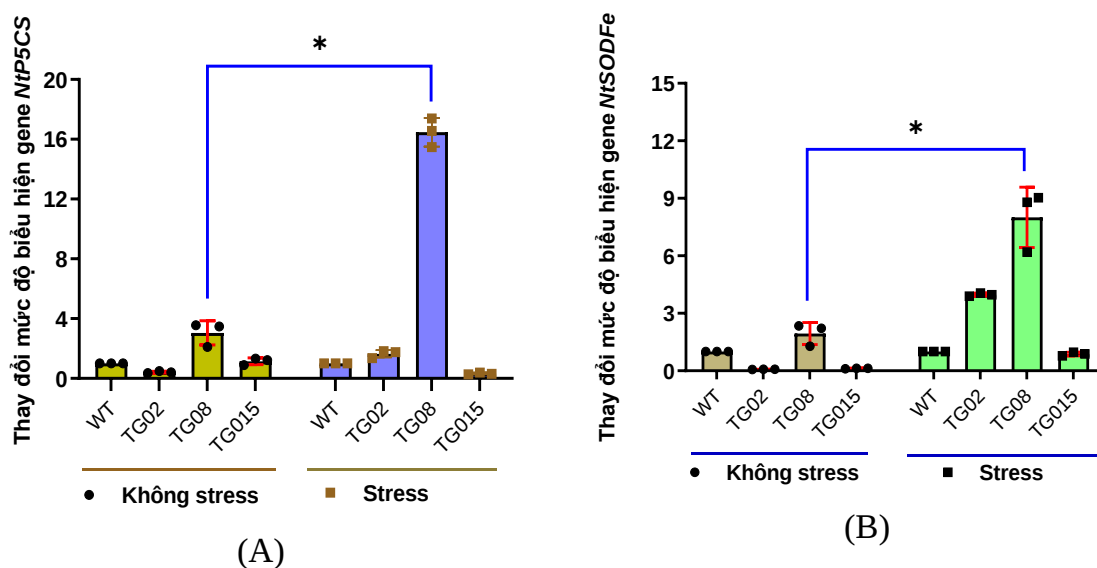
không xử lý và xử lý stress mặn ($p < 0,05$); (D, E) So sánh mức độ phiên mã của dòng chuyển gene TG015 với cây WT trong hai điều kiện không xử lý và xử lý stress mặn ($p < 0,05$); (G) So sánh mức độ phiên mã của dòng chuyển gene TG08 giữa điều kiện xử lý stress mặn và điều kiện không xử lý ($p < 0,05$); (H) So sánh mức độ phiên mã của dòng chuyển gene TG015 giữa điều kiện xử lý stress mặn và điều kiện không xử lý ($p < 0,05$). WT: Cây không chuyển gene; TG02: Dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* thể hệ 0; TG08: Dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* thể hệ 0; TG015: Dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* thể hệ 0. Các cột biểu thị giá trị trung bình và các thanh biểu thị độ lệch chuẩn (SD). Các chấm biểu thị các mẫu riêng lẻ. Dấu * phía trên cột biểu thị mức ý nghĩa thống kê; $n=3$.

Kết quả so sánh mức độ phiên mã của gene chuyển *GmDREB5* giữa các dòng thuốc lá chuyển gene và giữa các dòng chuyển gene với cây WT trong điều kiện không stress và stress mặn được trình bày ở Hình 3.10. Kết quả cho thấy trong cả điều kiện tưới nước bình thường và điều kiện stress mặn, mức độ phiên mã của *GmDREB5* ở các dòng TG08 và TG015 đều cao hơn so với dòng TG02 và cây WT ($p < 0,05$) (Hình 3.10A). Dưới điều kiện stress mặn, mức độ phiên mã của *GmDREB5* ở các dòng TG08 và TG015 tăng rõ rệt so với cây WT, với mức tăng tương ứng là 87,31 lần ở TG08 và 39,07 lần ở TG015. Đồng thời, mức độ phiên mã ở hai dòng này cũng cao hơn so với điều kiện không stress, với mức tăng lần lượt là 4,76 lần ở TG08 và 20,51 lần ở TG015 ($p < 0,05$) (Hình 3.10A, B, C, D, E, G, H). Những kết quả này cho thấy *GmDREB5* được biểu hiện trong các dòng thuốc lá chuyển gene và được cảm ứng mạnh dưới điều kiện stress mặn, phù hợp với vai trò của các nhân tố phiên mã thuộc phân họ DREB trong điều hòa đáp ứng đối với stress phi sinh học.

Các điều kiện stress phi sinh học như hạn hán và nhiễm mặn thường dẫn đến sự mất cân bằng trạng thái oxy hóa - khử trong tế bào, kéo theo sự tích lũy quá mức của các loại oxy phản ứng (ROS) và gây tổn thương cho các cấu trúc tế bào. Ở cây thuốc lá, hệ thống enzyme SOD bao gồm ba nhóm chính là SODFe, SODMn và SODCu/Zn, trong đó SODFe giữ vai trò quan trọng trong việc kiểm soát stress oxy hóa. Các isoform SOD này chủ yếu được phân bố tại lục lạp và ty thể là những bào quan có cường độ hình thành ROS cao trong điều kiện bất lợi. SODFe tham gia trực

tiếp vào tuyến phòng vệ đầu tiên của tế bào bằng cách xúc tác quá trình chuyển hóa anion superoxide (O_2^-) thành oxy phân tử (O_2) và hydrogen peroxide (H_2O_2). Sản phẩm H_2O_2 sau đó tiếp tục được loại bỏ thông qua hoạt động của các enzyme chống oxy hóa khác như catalase và peroxidase, qua đó hạn chế sự tích lũy ROS và ngăn ngừa tổn thương oxy hóa đối với lipid, protein và acid nucleic. Nhờ cơ chế này, SODFe góp phần duy trì cân bằng nội môi, tăng cường khả năng chống chịu với stress hạn và mặn, đồng thời hỗ trợ duy trì sinh trưởng và phát triển của cây trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt [91], [120].

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 được thể hiện ở biểu đồ Hình 3.11 (A và B). Trong Hình 3.11A, gene *NtP5CS* ở dòng chuyển gene TG08 có mức độ phiên mã cao hơn 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.



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.

WT: Cây không chuyển gene; TG02, TG08, TG015: Dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5* ở thế hệ 0. Các cột biểu thị giá trị trung bình và các thanh trên mỗi cột biểu thị độ lệch chuẩn hình học (SD). Các chấm đại diện cho các mẫu riêng lẻ. Dấu * phía trên cột biểu thị mức ý nghĩa thống kê; n = 3.

Trong Hình 3.11B, gene *NtSODFe* ở cả hai dòng TG02 và TG08 đều biểu hiện mạnh hơn dưới điều kiện stress mặn so với điều kiện không stress, với mức tăng tương ứng 4,12 lần ở TG08 và 51,60 lần ở TG02 ($p < 0,05$). Đồng thời, mức độ phiên mã của *NtSODFe* ở các dòng chuyển gene cũng vượt mức ghi nhận ở cây WT, với mức tăng tương ứng 1,95 lần (không stress) và 8,01 lần (stress mặn) ở TG08; 0,08 lần (không stress) và 3,97 lần (stress mặn) ở TG02 ($p < 0,05$). Sự gia tăng mạnh mức độ phiên mã dưới điều kiện stress mặn, đặc biệt ở dòng TG08, cho thấy khả năng đáp ứng hiệu quả đối với stress oxy hóa.

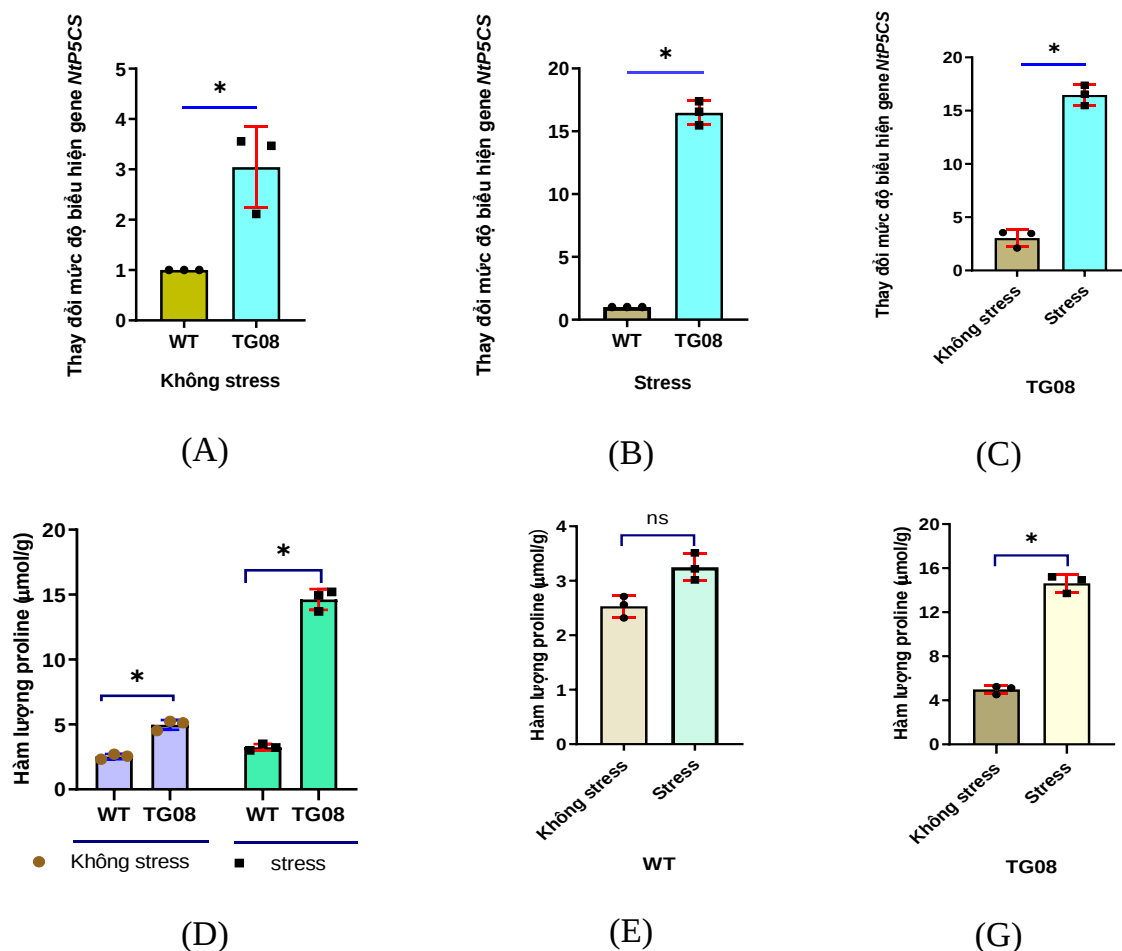
Các kết quả này cho thấy sự biểu hiện tăng cường của gene *GmDREB5* có mối liên hệ chặt chẽ với sự cảm ứng phiên mã của các gene tham gia cơ chế điều hòa áp suất thẩm thấu thông qua sinh tổng hợp proline (*NtP5CS*) và hệ thống chống oxy hóa (*NtSODFe*) khi cây chịu stress mặn. Qua đó, *GmDREB5* có thể đóng vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa 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

Sự gia tăng mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* ở các dòng thuốc lá chuyển gene *GmDREB5*, đặc biệt khi cây được đặt trong điều kiện stress mặn, cho thấy rằng gene *GmDREB5* có thể tham gia điều hòa con đường sinh tổng hợp proline. Trên cơ sở đó, việc đánh giá sự biến động hàm lượng proline trong các dòng chuyển gene là cần thiết nhằm làm rõ mối liên hệ giữa điều hòa phiên mã và đáp ứng sinh lý, qua đó góp phần làm sáng tỏ vai trò của cơ chế này trong việc tăng cường khả năng thích nghi của cây thuốc lá trước tác động của stress mặn.

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. Kết quả phân tích qRT-PCR cho thấy, trong điều kiện không xử lý, mức độ phiên mã của *NtP5CS* ở dòng TG08 cao hơn khoảng 3,05 lần so với WT (Hình 3.12A). Khi cây được xử lý bằng stress mặn, 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). Đồng thời, so sánh trong cùng dòng TG08 cho thấy mức phiên mã của *NtP5CS* tăng 5,41 lần dưới điều kiện stress mặn so với điều kiện không xử lý (Hình 3.12C). 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). Ngoài ra, khi so sánh giữa hai điều kiện xử lý trong cùng dòng TG08, hàm lượng proline tăng khoảng 2,94 lần dưới tác động của stress muối (Hình 3.12G), trong khi ở cây WT sự gia tăng này không đáng kể (Hình 3.12E).



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 ($p < 0.05$). (C) Biểu đồ so sánh mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* trong dòng chuyển gene TG08 giữa điều kiện không xử lý và xử lý stress mặn ($p < 0.05$). (D, E, G) 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 ($p < 0.05$). Các cột biểu thị giá trị trung bình và các thanh biểu thị độ lệch chuẩn (SD). Các chấm biểu thị các mẫu riêng lẻ. Dấu * phía trên cột biểu thị mức ý nghĩa thống kê; $n = 3$.

Kết quả cho thấy sự tăng cường biểu hiện của *NtP5CS* ở dòng thuốc lá chuyển gene TG08 có mối tương quan chặt chẽ với sự tích lũy proline, đặc biệt trong điều kiện stress mặn. Như vậy, gene *GmDREB5* có thể tham gia điều hòa gián tiếp con đường sinh tổng hợp proline thông qua việc kích hoạt biểu hiện *NtP5CS*, qua đó góp phần nâng cao khả năng thích nghi với stress mặn ở cây thuốc lá chuyển gene.

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

Kết quả mô phỏng docking phân tử *in silico* giữa miền AP2 của protein DREB5 và các vùng promoter của những gene mục tiêu, bao gồm *P5CS* và *SODFe*, được tổng hợp trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Các giá trị docking phân tử của phức hợp AP2-promoter SODFe và AP2-promoter P5CS

Các đặc tính docking	AP2-promoter P5CS	AP2-promoter SODFe
Năng lượng liên kết (kcal/mol)	-80,2 ± - 4,6	-16,3 ± 16,9
RMSD (Å)	19,5 ± - 0,1	9,2 ± - 1,3
Năng lượng Van der Waals (kcal/mol)	-49,9 ± - 3,4	-59,4 ± - 10,6
Năng lượng tĩnh điện (kcal/mol)	-176,4 ± - 8,1	-169,2 ± - 63,5
Năng lượng loại bỏ dung môi (kcal/mol)	1,9 ± - 2,7	3,7 ± - 2,8
Năng lượng vi phạm hạn chế (kcal/mol)	30,6 ± - 2,2	732,2 ± - 29,4
Diện tích bề mặt bị che lấp (Å ²)	1270,5 ± - 73,7	1848,6 ± - 149,4
Điểm Z	-0,7	-0,9

Năng lượng liên kết được sử dụng như một chỉ số phản ánh năng lượng tự do của quá trình hình thành phức hợp protein - DNA, trong đó các giá trị âm lớn hơn thể hiện xu hướng tương tác thuận lợi và độ ổn định cao hơn của phức hợp. Kết quả phân tích cho thấy phức hợp AP2 - promoter P5CS có năng lượng liên kết trung bình đạt -80,2 ± - 4,6kcal/mol, thấp hơn đáng kể so với phức hợp AP2 - promoter SODFe (-16,3 ± 16,9 kcal/mol). Sự khác biệt rõ rệt này cho thấy miền AP2 của DREB5 có ái lực liên kết mạnh hơn đối với promoter của gene *P5CS* so với promoter của *SODFe*. Đồng thời, độ lệch chuẩn lớn quan sát được ở phức hợp AP2-SODFe phản ánh sự biến thiên đáng kể giữa các cấu hình ghép nối, gợi ý rằng tương tác này có độ ổn định thấp hơn.

Độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) được sử dụng để đánh giá mức độ sai khác về cấu trúc giữa các tư thế tương tác so với cấu hình có năng lượng thấp nhất. Phức hợp AP2-promoter SODFe có giá trị RMSD trung bình là $9,2 \pm 1,3 \text{ \AA}$, thấp hơn so với phức hợp AP2 - promoter P5CS ($19,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$), cho thấy các cấu hình tương tác của AP2 - promoter SODFe có xu hướng hội tụ gần hơn với trạng thái cấu trúc tối ưu. Ngược lại, giá trị RMSD cao hơn ở phức hợp AP2 - promoter P5CS phản ánh sự biến động cấu trúc lớn hơn trong quá trình mô phỏng, mặc dù phức hợp này vẫn đạt được năng lượng liên kết thuận lợi.

Phân tích chi tiết các thành phần năng lượng cho thấy tương tác tĩnh điện đóng vai trò chủ đạo trong quá trình hình thành và ổn định phức hợp protein - DNA. Phức hợp AP2 - P5CS có giá trị năng lượng tĩnh điện trung bình đạt $-176,4 \pm 8,1 \text{ kcal/mol}$, thấp hơn so với phức hợp AP2 - SODFe ($-169,2 \pm 63,5 \text{ kcal/mol}$), phản ánh mức độ tương tác điện tích mạnh và đồng nhất hơn ở phức hợp AP2 - P5CS. Ngược lại, độ lệch chuẩn lớn ghi nhận ở phức hợp AP2 - SODFe cho thấy sự biến thiên đáng kể giữa các cấu hình mô phỏng, gợi ý tính không ổn định của các tương tác tĩnh điện trong phức hợp này.

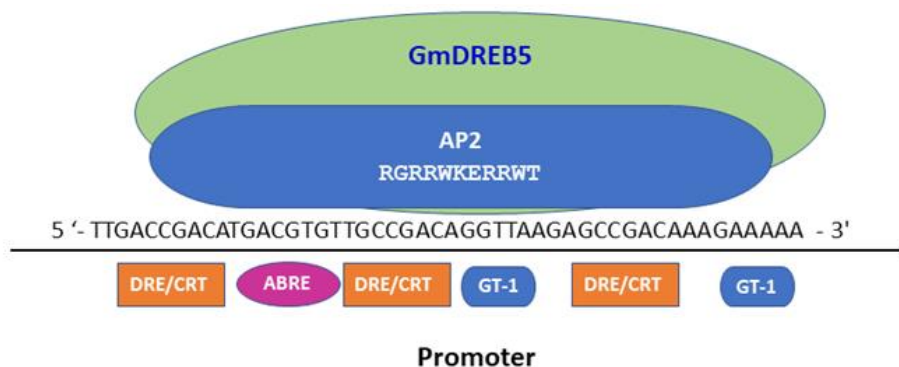
Năng lượng loại bỏ dung môi, đại diện cho năng lượng cần thiết để loại bỏ lớp nước hydrat hóa tại bề mặt liên kết, cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa hai phức hợp. Giá trị năng lượng này ở phức hợp AP2 - P5CS ($1,9 \pm 2,7 \text{ kcal/mol}$) thấp hơn so với AP2 - SODFe ($3,7 \pm 2,8 \text{ kcal/mol}$), cho thấy phức hợp AP2 - P5CS ít bị ảnh hưởng bởi môi trường dung môi và có khả năng duy trì tương tác bền vững hơn trong điều kiện sinh học.

Mức độ tuân thủ các ràng buộc hình học và không gian trong quá trình mô phỏng được phản ánh thông qua năng lượng vi phạm ràng buộc. Phức hợp AP2 - P5CS ghi nhận giá trị năng lượng vi phạm tương đối thấp ($30,6 \pm 2,2 \text{ kcal/mol}$) trong khi phức hợp AP2 - SODFe có giá trị rất cao ($732,2 \pm 29,4 \text{ kcal/mol}$). Kết quả này cho thấy cấu hình tương tác của AP2 - P5CS phù hợp hơn với các ràng buộc mô phỏng, qua đó nâng cao độ tin cậy của mô hình.

Diện tích bề mặt che lấp, phản ánh mức độ tiếp xúc không gian giữa hai phân tử trong phức hợp, được ghi nhận lớn hơn ở phức hợp AP2 - SODFe ($1848,6 \pm 149,4 \text{ \AA}^2$) so với AP2 - P5CS ($1270,5 \pm 73,7 \text{ \AA}^2$). Tuy nhiên, diện tích tiếp xúc lớn không nhất thiết đồng nghĩa với độ bền liên kết cao, đặc biệt khi các thông số năng lượng và ràng buộc cho thấy mức độ ổn định tổng thể của phức hợp AP2 - SODFe thấp hơn.

Điểm Z, được sử dụng để đánh giá chất lượng mô hình tương tác so với các cấu hình ngẫu nhiên, đạt -0,9 đối với phức hợp AP2 - SODFe và -0,7 đối với AP2 - P5CS. Mặc dù cả hai giá trị đều âm, cho thấy các mô hình tương tác có ý nghĩa hơn so với ngẫu nhiên, mức độ chênh lệch không lớn và chưa đạt ngưỡng tối ưu, do đó các kết quả dự đoán cần được củng cố thêm bằng các phân tích bổ sung và bằng chứng thực nghiệm.

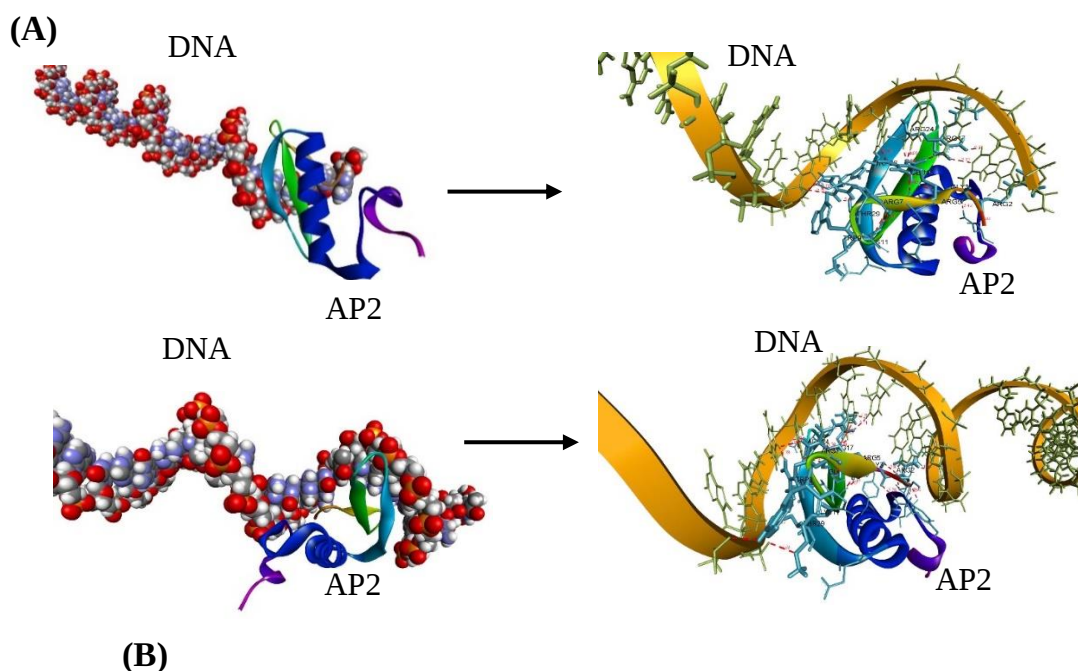
Các thông số cho thấy miền AP2 của protein DREB5 có xu hướng liên kết thuận lợi và ổn định hơn với vùng promoter của gene *P5CS* so với *SODFe*, qua đó gợi ý vai trò tiềm năng của DREB5 trong điều hòa biểu hiện các gene liên quan đến sinh tổng hợp proline, một cơ chế sinh lý quan trọng góp phần nâng cao khả năng chịu hạn và chịu mặn ở cây đậu tương chuyển gene.



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*.

Mũi tên chỉ ra vùng promoter được thiết kế có chứa các yếu tố tác động *cis* (DRE/CRT, ABRE, GT-1) và vị trí liên kết *trans*. Hình ảnh biểu diễn yếu tố phiên mã GmDREB5 màu xanh lá cây nhạt và vùng AP2 màu xanh lam đậm chứa các amino acid của các vị trí liên kết DNA.

Trong nghiên cứu này, kết quả mô phỏng tương tác cho thấy một số amino acid thuộc miền AP2 của GmDREB5, bao gồm Arg2, Gly3, Arg5, Arg7, Trp9, Lys11, Glu15, Arg17, Arg24, Trp26 và Thr29 có khả năng tham gia tương tác với các motif *cis* đáp ứng stress tại vùng promoter của hai gene *NtP5CS* và *NtSODFe* thông qua các liên kết hydrogen (liên kết H) (Hình 3.14A, B). Cụ thể, ở Hình 3.14A, miền AP2 tương tác với vùng đầu 5' của promoter chứa motif GT-1 (GAAAAA), trong khi ở Hình 3.14B, tương tác xảy ra tại vùng trung tâm của promoter chứa đồng thời motif DRE/CRT (RCCGAC) và GT-1. Trong đó, GT-1 được biết đến là yếu tố *cis* tham gia đáp ứng stress mặn, còn DRE/CRT giữ vai trò quan trọng trong điều hòa phản ứng của thực vật đối với các stress phi sinh học như hạn, mặn và lạnh.



Hình 3.14. Mô hình liên kết AP2 - promoter và mạng lưới liên kết hydrogen (H) giữa AP2 và DNA.

(A) Mô hình tương tác được xếp hạng cao nhất dựa trên điểm HADDOCK cho thấy các motif được bảo tồn của AP2 tương tác với DNA. (B) Mạng lưới liên kết H giữa các vị trí amino acid của vùng AP2 và các rãnh chính và rãnh phụ của DNA. Cấu trúc xoắn α và tấm β (AP2) được tô màu xanh lam đậm và xanh lam nhạt tương ứng. Cấu trúc xoắn kép DNA được tô màu cam.

3.2.5. Thảo luận kết quả

Độ mặn của đất được xem là một trong những yếu tố môi trường bất lợi nghiêm trọng, gây suy giảm đáng kể năng suất và chất lượng của nhiều loại cây trồng, trong đó có cây đậu tương. Nguyên nhân có thể do xâm nhập mặn hoặc sự tích lũy muối kéo dài trong đất canh tác dưới tác động của các biện pháp thâm canh, đặc biệt là việc sử dụng phân bón hóa học. Với đặc tính mẫn cảm đối với stress mặn, đậu tương đòi hỏi các chiến lược cải tiến di truyền hiệu quả nhằm nâng cao khả năng thích nghi và duy trì sinh trưởng ổn định trong điều kiện bất lợi. Trong bối cảnh đó, việc xác định và làm sáng tỏ chức năng của các gene điều hòa trung tâm, đặc biệt là các gene mã hóa nhân tố phiên mã tham gia đáp ứng stress phi sinh học, được xem là hướng tiếp cận có nhiều tiềm năng.

Gene thuộc phân họ *DREB*, mã hóa yếu tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF đã được chứng minh giữ vai trò quan trọng trong việc điều hòa mạng lưới gene đáp ứng với hạn và mặn thông qua cơ chế kích hoạt các gene mang các yếu tố *cis* đặc trưng trong vùng promoter. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, việc biểu hiện tăng cường các gene *DREB* có thể cải thiện rõ rệt khả năng chịu stress ở thực vật, thông qua các cơ chế như duy trì hàm lượng nước tương đối, tăng tích lũy proline và tăng cường hoạt động của hệ thống chống oxy hóa [19], [22], [41], [90], [123]. Các kết quả thu được trong nghiên cứu phù hợp với xu hướng chung đó, đồng thời cung cấp thêm những bằng chứng mới về vai trò điều hòa của gene *GmDREB5* ở đậu tương.

GmDREB5 là gene mã hóa yếu tố phiên mã DREB liên quan đến đáp ứng stress hạn và mặn đã được phân lập, chứa miền liên kết AP2 đặc trưng với chiều dài 63 amino acid. So với một số protein DREB khác ở đậu tương như DREB2, DREB6 và DREB7, có miền AP2 ngắn hơn (khoảng 59 - 60 amino acid), miền AP2 của *GmDREB5* có sự khác biệt nhất định về độ dài. Tuy nhiên, phân tích trình tự cho thấy các protein DREB này đều bảo tồn 11 vị trí amino acid quan trọng tham gia vào quá trình nhận diện và liên kết DNA. Điều này cho thấy mặc dù tồn tại sự khác biệt về cấu trúc chuỗi, chức năng cốt lõi liên quan đến điều hòa phiên mã của

miền AP2 vẫn được bảo tồn cao. Sự khác biệt về độ dài miền AP2 của *GmDREB5* có thể ảnh hưởng đến mức độ ái lực hoặc tính đặc hiệu trong tương tác với các yếu tố *cis*, hơn là làm thay đổi vai trò điều hòa cơ bản của protein này.

Dưới tác động của stress mặn, mức độ phiên mã của *GmDREB5* tăng mạnh ở các dòng thuốc lá chuyển gene, đặc biệt là dòng TG08, so với điều kiện không xử lý và so với cây đối chứng. Kết quả này tương đồng với các báo cáo trước đây về một số gene *DREB* ở đậu tương như *GmDREB1*, *GmDREB2* và *GmDREB6* [88], [109], [129] đồng thời cho thấy *GmDREB5* là một thành viên tiềm năng của phân họ *DREB* chưa được khai thác sâu về mặt chức năng.

Khả năng chịu hạn và chịu mặn của cây trồng có mối liên hệ chặt chẽ với việc duy trì cân bằng nước nội bào, trong đó sự tích lũy các chất điều hòa thẩm thấu, đặc biệt là proline, đóng vai trò then chốt. Proline không chỉ tham gia điều chỉnh áp suất thẩm thấu mà còn góp phần ổn định cấu trúc protein, bảo vệ màng tế bào và tham gia loại bỏ các ROS. Các enzyme tham gia sinh tổng hợp proline, tiêu biểu là P5CS và P5CR, thường được cảm ứng mạnh trong điều kiện stress. Trong nghiên cứu này, mức độ phiên mã của gene *NtP5CS* tăng đáng kể ở các dòng thuốc lá chuyển gene mang *GmDREB5*, đặc biệt dưới điều kiện stress mặn, cho thấy *GmDREB5* có khả năng tham gia điều hòa con đường sinh tổng hợp proline. Mối tương quan chặt chẽ giữa mức biểu hiện của *GmDREB5* và *NtP5CS* ($R = 99,56\%$) củng cố giả thuyết rằng *GmDREB5* là một nhân tố điều hòa dương, góp phần thúc đẩy tích lũy proline và nâng cao khả năng chịu mặn của cây chuyển gene.

Bên cạnh điều hòa cân bằng thẩm thấu, stress mặn còn gây tích lũy quá mức các dạng oxy phản ứng, dẫn đến tổn thương oxy hóa và suy giảm chức năng sinh lý của cây [15]. Để đối phó với tình trạng này, thực vật kích hoạt hệ thống enzyme chống oxy hóa, trong đó superoxide dismutase, đặc biệt là SODFe, giữ vai trò trung tâm trong việc chuyển hóa gốc superoxide thành hydrogen peroxide ít độc hơn [37]. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức phiên mã của *NtSODFe* tăng rõ rệt ở các dòng thuốc lá chuyển gene mang *GmDREB5* dưới điều kiện stress mặn, với mức tăng nổi bật ở dòng TG02. Mối tương quan cao giữa *GmDREB5* và *NtSODFe* ($R = 94,46\%$)

cho thấy *GmDREB5* có thể tham gia điều hòa trực tiếp hoặc gián tiếp hệ thống chống oxy hóa, qua đó góp phần hạn chế tổn thương oxy hóa trong điều kiện mặn.

Đáng chú ý, 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 hydrogen ổn định với DNA, cho thấy khả năng gắn kết đặc hiệu và có ý nghĩa sinh học. 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.

Các kết quả cho thấy *GmDREB5* không chỉ tham gia điều hòa đáp ứng stress mặn thông qua việc tăng cường tích lũy proline và hoạt hóa hệ thống chống oxy hóa, mà còn thể hiện vai trò điều hòa phiên mã trực tiếp đối với các gene mục tiêu quan trọng. So với các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào một số gene *DREB* đã được mô tả, nghiên cứu này cung cấp thêm những bằng chứng mới về chức năng của *GmDREB5*, góp phần mở rộng hiểu biết về mạng lưới điều hòa đáp ứng stress mặn ở đậu tương. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn các tương tác được dự đoán từ mô phỏng *in silico*, cần tiếp tục tiến hành các thí nghiệm ở mức phân tử như ChIP-qPCR hoặc EMSA trong các nghiên cứu tiếp theo.

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

Các gene thuộc phân họ DREB, mã hóa yếu tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF có khả năng kích hoạt hoặc điều hòa biểu hiện của nhiều gene mục tiêu liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học ở thực vật [130]. Ở cây đậu tương, một số gene thuộc phân họ này như *DREB1*, *DREB2* và *DREB6* đã được chứng minh có mối liên hệ chặt chẽ với cơ chế thích nghi trước các điều kiện môi trường bất lợi, bao gồm nhiệt độ thấp, hạn hán và mặn [82], [88]. Việc biểu hiện quá mức gene *DREB1* trong đậu tương được báo cáo là giúp nâng cao khả năng chịu hạn, đồng thời thúc đẩy sự phát triển của hệ rễ

và làm chậm quá trình lão hóa lá ở các dòng cây chuyển gene [129]. Bên cạnh đó, khi cây tiếp nhận tín hiệu stress từ môi trường, hoạt động phiên mã của các gene *DREB2* và *DREB6* được kích hoạt, kéo theo sự gia tăng hàm lượng proline, qua đó góp phần cải thiện khả năng chịu hạn và chịu mặn ở cây đậu tương chuyển gene [82], [88], [109].

Đối với gene *GmDREB7*, các thí nghiệm trước đây của Nhóm nghiên cứu đã bước đầu tập trung vào việc đánh giá chức năng của gene trên cây thuốc lá mô hình. Cụ thể, *GmDREB7* đã được phân tích về khả năng điều hòa biểu hiện của các gene *RD29A* và *SODFe* trong cây thuốc lá chuyển gene mang *GmDREB7* dưới cả điều kiện sinh trưởng bình thường và xử lý stress mặn. Kết quả cho thấy, trong điều kiện stress mặn, sự biểu hiện quá mức *GmDREB7* dẫn đến ức chế phiên mã của hai gene mục tiêu *RD29A* và *SODFe* ở cây thuốc lá [83]. Trong nghiên cứu này, chức năng của gene *GmDREB7* được tiếp tục khảo sát trực tiếp trên cây đậu tương, trong cả điều kiện sinh trưởng bình thường và xử lý stress mặn, nhằm làm sáng tỏ vai trò điều hòa phiên mã của gene này trong điều kiện môi trường bất lợi.

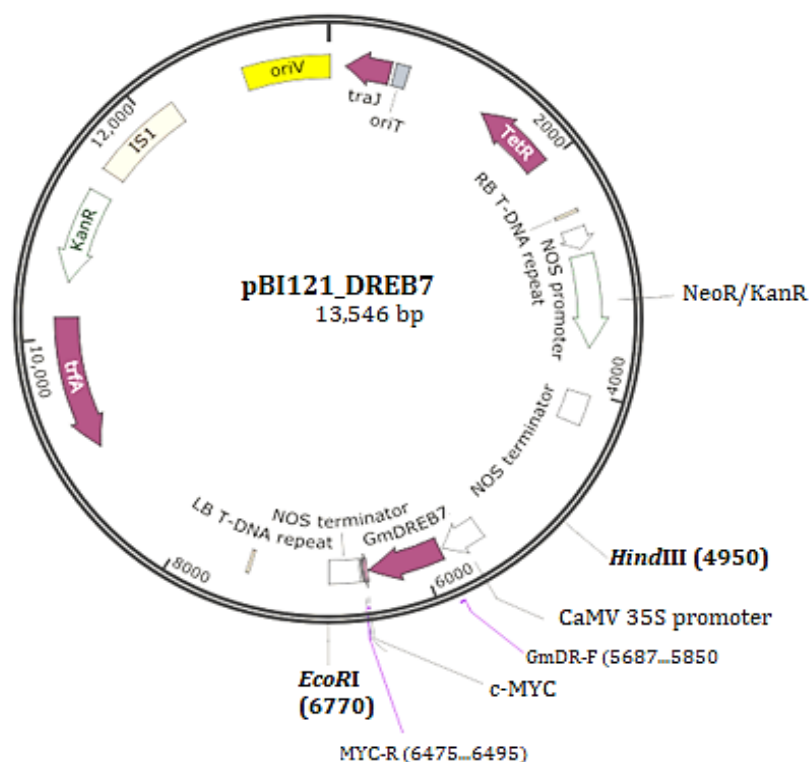
3.3.1. Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene *GmDREB7* vào cây đậu tương và tạo cây đậu tương chuyển gene

3.3.1.1. Biến nạp di truyền cấu trúc mang gene *GmDREB7* vào cây đậu tương

Gene *GmDREB7* của đậu tương nằm trên nhiễm sắc thể 20, có vùng mã hóa dài 624 bp, mã hóa protein gồm 207 amino acid, chứa miền AP2 đặc trưng. Trình tự gene *GmDREB7* được tổng hợp dựa trên dữ liệu trình tự đã công bố của đậu tương, với mã số truy cập trên GenBank là NM_001248108.2, gene được thiết kế gồm vùng mã hóa, bổ sung peptide c-myc (phục vụ phát hiện protein) và tín hiệu KDEL (định vị nội bào). Các vị trí cắt enzyme (*XbaI*, *BamHI*, *SacI*, *XmaI*) được gắn vào hai đầu để thuận tiện cho thao tác tạo dòng và gene được chèn vào vector pJET1.2 [83] (Phụ lục 13).

Đoạn gene *GmDREB7* sau khi tổng hợp được gắn vào vector biểu hiện pBI121 bằng phương pháp cắt - nối sử dụng enzyme giới hạn. Cấu trúc vector tái tổ hợp pBI121_ *GmDREB7* bao gồm promoter CaMV35S, vùng mã hóa của gene

GmDREB7 và các trình tự cần thiết cho quá trình tạo dòng và lắp ráp vector (Hình 3.15). Sau khi tạo cấu trúc tái tổ hợp, vector pBI121_ *GmDREB7* được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* và kiểm tra bằng enzyme giới hạn để xác nhận sự có mặt của đoạn gene chèn. Tiếp theo, vector tái tổ hợp được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng AGL1 nhằm phục vụ cho quá trình biến nạp gene vào lá mầm đậu tương.

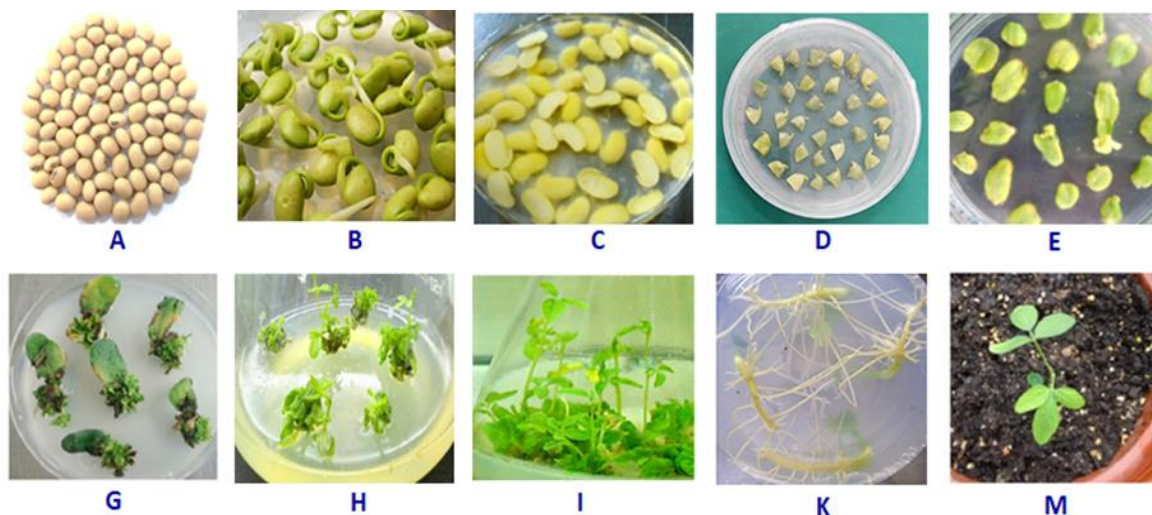


Hình 3.15. Sơ đồ cấu trúc vector pBI121_ *GmDREB7*.

LB: biên trái vùng T-DNA; RB: biên phải vùng T-DNA; CaMV35S: promoter 35S của virus khảm súp lơ; *GmDREB7*: vùng mã hóa của gene *GmDREB7*; Noster: trình tự kết thúc phiên mã; *HindIII* và *EcoRI*: vị trí cắt của các enzyme hạn chế tương ứng; GmDR-F: mồi xuôi; MYC-R: mồi ngược; cặp mồi GmDR-F/MYC-R được sử dụng để khuếch đại đoạn gene chuyển nạp *GmDREB7*.

Thí nghiệm chuyển gene được tiến hành lặp lại ba lần, mỗi lần sử dụng 30 mẫu lá mầm. Sau khi biến nạp, các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện vô trùng và tiến hành chọn lọc trên môi trường có bổ sung kanamycin. Thông qua quá

trình chọn lọc và tái sinh, 18 chồi phát triển khỏe mạnh đã được thu nhận và chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ. Trong số này, 10 cây chuyển gene thuộc thế hệ TG0 sinh trưởng ổn định và được lựa chọn để chuyển ra trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới.



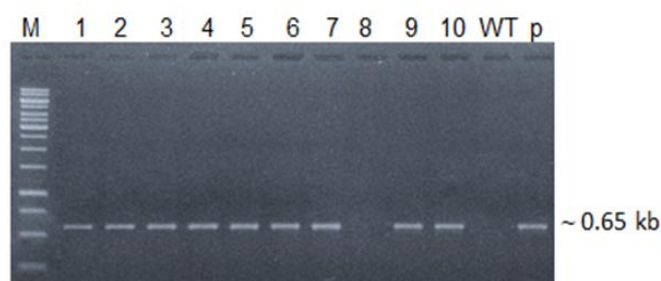
Hình 3.16. Hình ảnh biến nạp, tái sinh *in vitro* và tạo cây đậu tương chuyển gene.

A: Hạt đậu tương ĐT26; B-C: Các lá mầm được lây nhiễm bởi *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp *pBI121_GmDREB7* trong 30 phút; D: Đồng nuôi cấy trong môi trường CCM ở điều kiện tối 5 ngày; E-G: Các lá mầm nhiễm khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tái sinh đa chồi SIM; H-I: Lá mầm đã loại bỏ khỏi chồi và chồi được nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi SEM; K: Các chồi chuyển gene tái sinh rễ trên môi trường RM; M: Cây con chuyển sang chậu chứa hỗn hợp được trồng trong nhà lưới.

Đối với nhóm đối chứng, 20 mẫu lá mầm không chuyển gene được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung kháng sinh, kết quả thu được 8 cây sinh trưởng tốt, được chuyển ra trồng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới. Bên cạnh đó, đối chứng âm được thiết lập bằng cách nuôi cấy các mẫu lá mầm không chuyển gene trên môi trường có bổ sung kháng sinh và kết quả cho thấy 100% các mẫu lá mầm không hình thành chồi.

3.3.1.2. Xác định sự có mặt của gene chuyển *GmDREB7* trong hệ gene ở các cây đậu tương được chuyển gene ở thế hệ TG0

Để kiểm tra sự hiện diện và hoạt động phiên mã của gene chuyển *GmDREB7* trong hệ gene của 10 cây đậu tương chuyển gene thế hệ TG0, kỹ thuật RT-PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi đặc hiệu GmDR-F/c-myc-R (Hình 3.17). 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).



Hình 3.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác nhận sự có mặt của gene chuyển *GmDREB7* trong các cây đậu tương chuyển gene TG0.

M: thang chuẩn DNA 1 kb; 1-10: các cây chuyển gene TG0; WT (Wild-Type): cây đậu tương không chuyển gene; p: plasmid pBI121_ *GmDREB7*.

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, tạo cơ sở cho các phân tích chức năng tiếp theo của gene này trong điều kiện sinh trưởng bình thường và stress.

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 (TG0-2, TG0-3, TG0-4, TG0-5, TG0-6, TG0-7 và TG0-10) 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, trong khi ba cây còn lại (TG0-3, TG0-4 và TG0-6) chỉ hình thành quả rỗng, không chứa hạt. Hạt thu được từ bốn cây TG0 có khả năng sinh sản 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. Các dòng TG1 được sử dụng cho các thí nghiệm phân tích tiếp theo nhằm đánh giá tính ổn định di truyền và chức năng sinh học của gene *GmDREB7*.

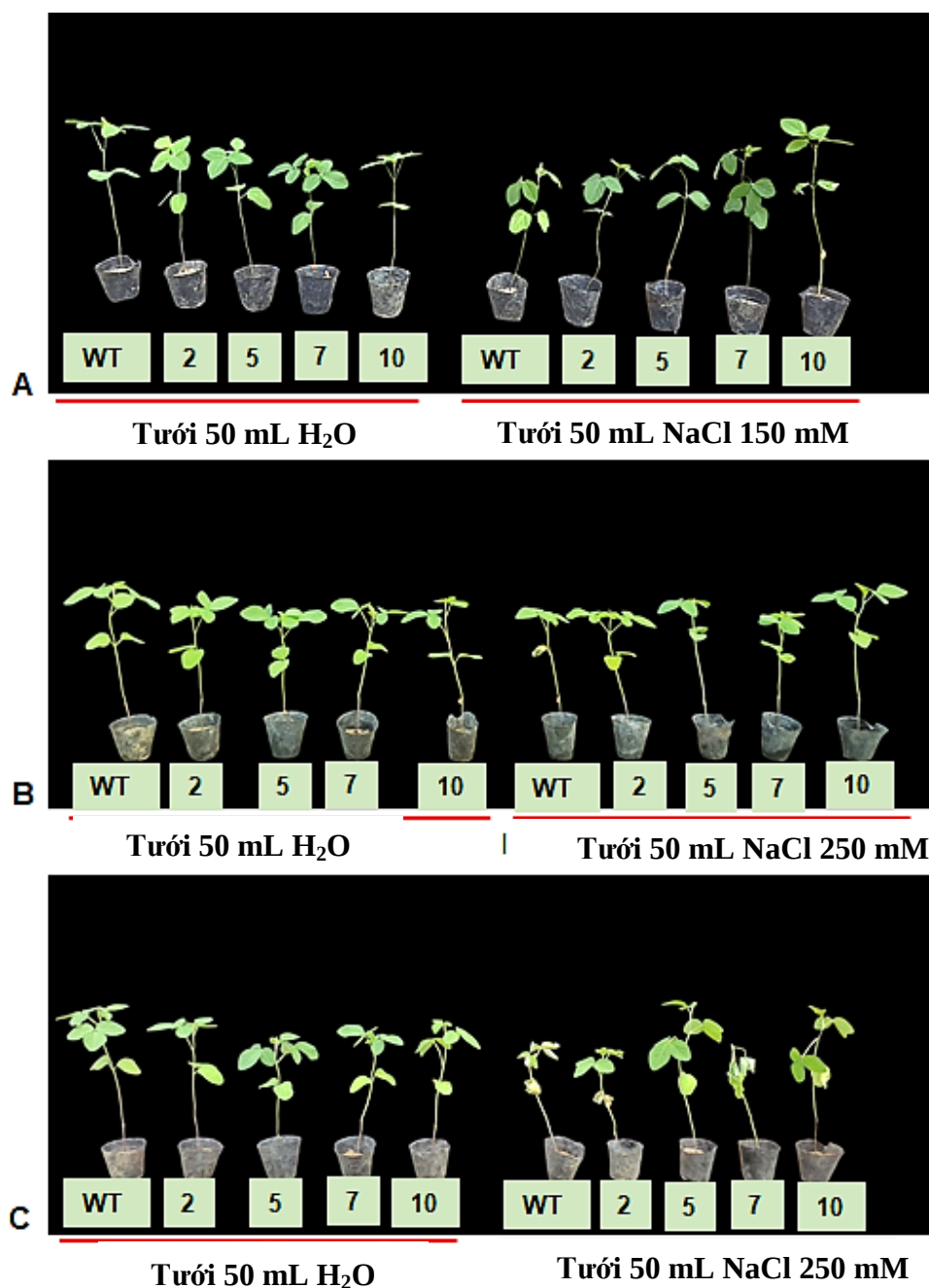
3.3.2. Phân tích các dòng đậu tương chuyển gene

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 ở 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. Cụ thể, ở lần tưới đầu tiên, mỗi cây được xử lý với 50 mL dung dịch NaCl 150 mM; hai lần tưới tiếp theo sử dụng 50 mL dung dịch NaCl 250 mM cho mỗi cây (Hình 3.18).

Kết quả quan sát hình thái cho thấy, sau 2 ngày xử lý ở lần tưới thứ nhất với nồng độ 150 mM NaCl (Hình 3.18A), cây WT và các dòng chuyển gene chưa biểu hiện sự khác biệt rõ rệt về hình thái sinh trưởng. Điều này cho thấy 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.

Ngược lại, ở lô thí nghiệm thứ hai với nồng độ NaCl 250 mM (Hình 3.18B), các dấu hiệu ảnh hưởng bất lợi của stress mặn bắt đầu xuất hiện rõ rệt trên cả cây đối chứng WT và các dòng đậu tương chuyển gene. Mức độ tác động của stress mặn trở nên nghiêm trọng hơn sau lần xử lý thứ ba (Hình 3.18C). Ở thời điểm này, 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.



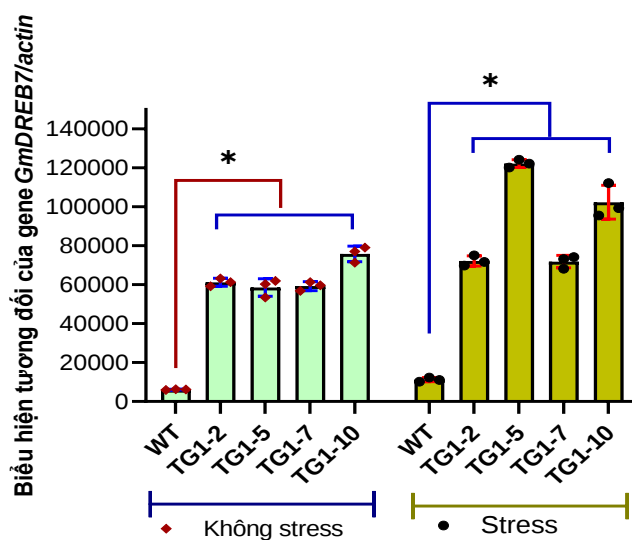
Hình 3.18. Hình ảnh cây đậu tương chuyển gene ở thể hệ TG1 và cây đối chứng trong điều kiện tưới nước và xử lý stress mặn.

A: Xử lý stress mặn bằng NaCl 150mM sau 3 ngày; B: Xử lý stress mặn bằng NaCl 250mM sau 5 ngày; C: Xử lý stress mặn bằng NaCl 250mM sau 7 ngày; WT: Cây không chuyển gene; 2, 5, 7 và 10: các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1.

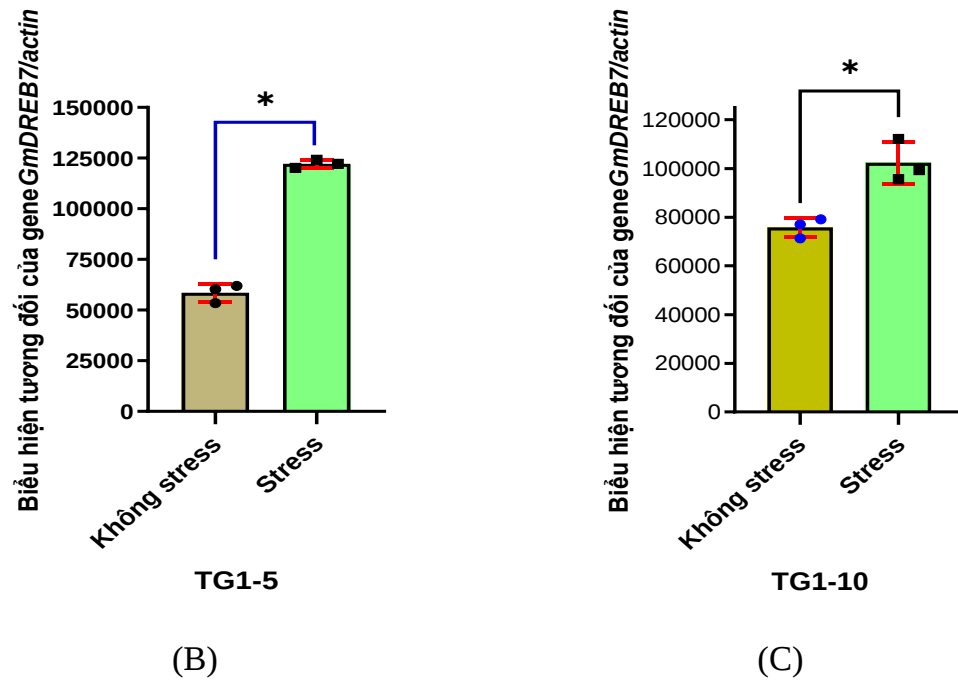
3.3.2.2. Phân tích mức độ phiên mã của *GmDREB7* ở dòng đậu tương chuyển gene và cây WT sau 7 ngày trong điều kiện stress NaCl

Lá của cây đậu tương WT và bốn dòng chuyển gene thể hệ TG1 được thu thập sau 7 ngày xử lý stress mặn, cụ thể là 2 ngày sau lần xử lý thứ hai với 50 mL dung dịch NaCl 250 mM. Mẫu lá được sử dụng để tách RNA tổng số, tổng hợp cDNA và tiến hành phân tích mức độ phiên mã của gene *GmDREB7* bằng phương pháp qRT-PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu qRT-DREB7-F/qRT-DREB7-R; kết quả phân tích được trình bày trong Hình 3.19.

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. Khi xử lý stress mặn, mức độ phiên mã của *GmDREB7* ở các dòng chuyển gene TG1 tiếp tục gia tăng đáng kể so với điều kiện không xử lý, đồng thời cao hơn rõ rệt so với cây WT ($p < 0,05$). Trong số các dòng được phân tích, TG1-5 và TG1-10 thể hiện mức cảm ứng mạnh hơn so với các dòng còn lại.



(A)



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.

(A) Mức độ phiên mã của *GmDREB7* ở các dòng đậu tương chuyển gene so với cây WT trong điều kiện không xử lý stress và xử lý bằng stress mặn ($p < 0,05$); (B, C) So sánh mức độ phiên mã của *GmDREB7* ở các dòng chuyển gene TG1-5 và TG1-10 giữa điều kiện xử lý stress mặn và điều kiện không xử lý ($p < 0,05$). Gene tham chiếu được sử dụng trong phân tích qRT-PCR là *Sac1* (Actin); WT: Cây không chuyển gene; TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10: Các dòng chuyển gene thuộc thể hệ TG1. Các ký hiệu * phía trên các cột của biểu đồ biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Các cột biểu đồ biểu thị giá trị trung bình và các thanh trên mỗi cột biểu đồ biểu thị độ lệch chuẩn (SD). Các chấm biểu thị các mẫu riêng lẻ; $n = 3$.

Hình 3.19B và Hình 3.19C trình bày phân tích chi tiết sự thay đổi mức độ biểu hiện *GmDREB7* giữa điều kiện xử lý và không xử lý ở hai dòng TG1-5 và TG1-10. Kết quả cho thấy, ở cả hai dòng, xử lý với NaCl 250 mM đều dẫn đến sự gia tăng rõ rệt mức độ phiên mã *GmDREB7* so với đối chứng không xử lý. Trong đó, dòng

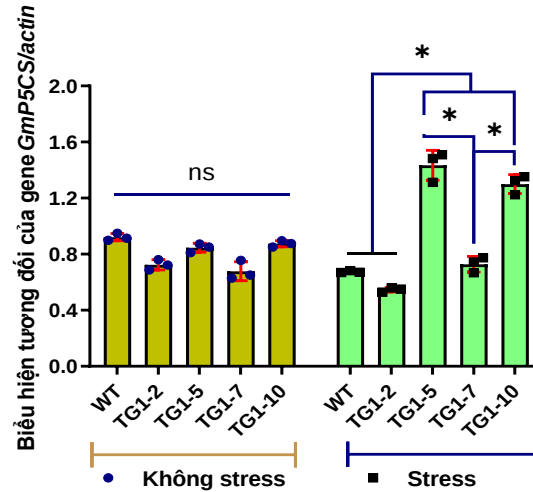
TG1-5 thể hiện mức cảm ứng mạnh hơn với mức tăng khoảng 2,5 lần, trong khi dòng TG1-10 chỉ ghi nhận mức tăng khoảng 1,3 lần. Kết quả này cho thấy gene *GmDREB7* được cảm ứng và tăng cường phiên mã dưới điều kiện stress mặn, đồng thời phản ánh sự khác biệt về mức độ đáp ứng giữa các dòng chuyển gene.

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

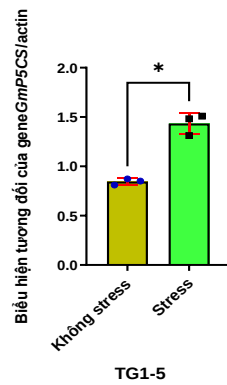
Proline là một amino acid có vai trò quan trọng như chất điều hòa thẩm thấu, tham gia duy trì áp suất thẩm thấu nội bào, ổn định cấu trúc tế bào và tăng khả năng giữ nước, từ đó góp phần nâng cao khả năng chống chịu của thực vật đối với stress mặn. Trên cơ sở vai trò sinh lý này, nghiên cứu tiếp tục khảo sát mối liên hệ giữa sự biểu hiện quá mức của gene *GmDREB7* và mức độ phiên mã của gene *GmP5CS*, gene mã hóa pyrroline-5-carboxylate synthase (*P5CS*), enzyme chủ chốt trong con đường sinh tổng hợp proline, ở các dòng đậu tương chuyển gene và cây WT, dưới cả điều kiện sinh trưởng bình thường và 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 ($p < 0,05$).

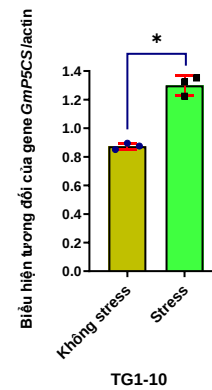
Kết quả phân tích ở Hình 3.20B và 3.20C cho thấy, ở cả hai dòng TG1-5 và TG1-10, mức độ phiên mã của gene *GmP5CS* đều tăng khi xử lý muối so với đối chứng không xử lý. Cụ thể, ở dòng TG1-5, mức phiên mã tăng từ khoảng 1,0 lên gần 1,7 lần, trong khi ở dòng TG1-10 tăng từ khoảng 1,0 lên xấp xỉ 1,3 lần ($p < 0,05$). Sự gia tăng này cho thấy gene *GmDREB7* đóng vai trò điều hòa tích cực, góp phần kích hoạt biểu hiện gene *GmP5CS*, qua đó thúc đẩy quá trình tổng hợp proline và tăng cường khả năng đáp ứng của cây đậu tương đối với stress mặn.



(A)



(B)

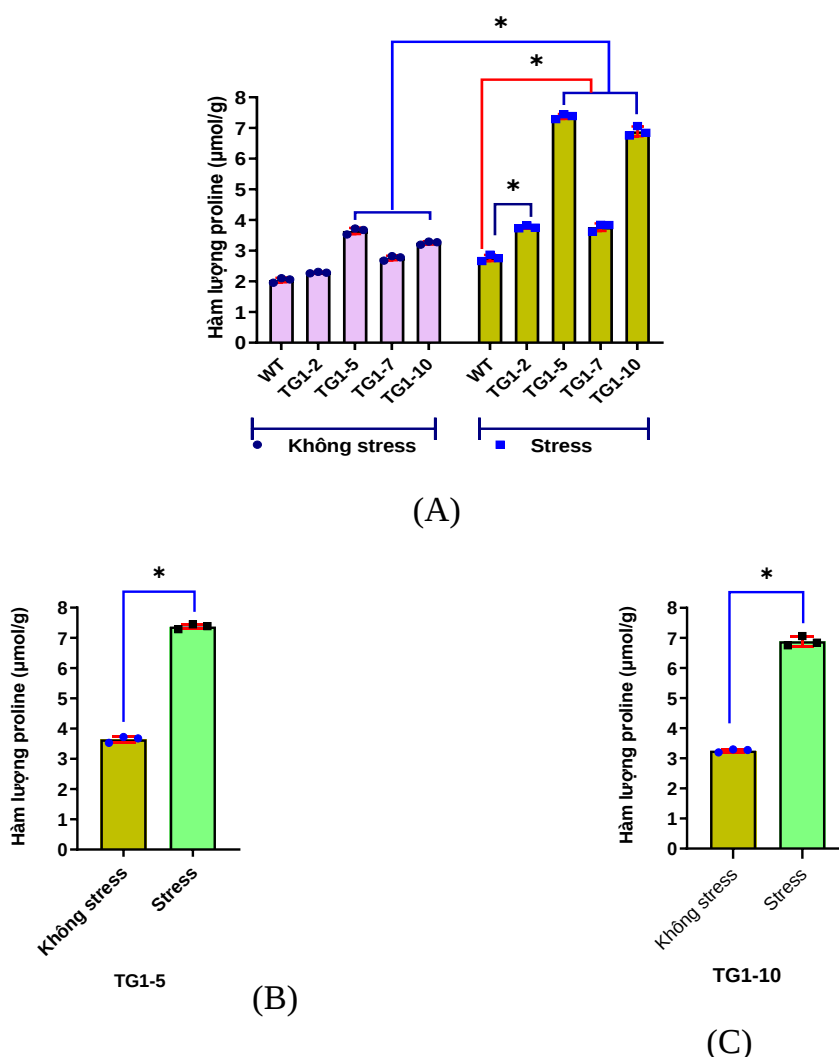


(C)

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.

(A) Mức độ phiên mã của *GmP5CS* ở các dòng chuyển gene so với cây WT trong điều kiện không xử lý stress và xử lý stress mặn ($p < 0,05$); (B, C) Mức độ phiên mã của *GmP5CS* ở các dòng chuyển gene TG1-5 và TG1-10 giữa điều kiện xử lý stress muối và điều kiện không xử lý ($p < 0,05$). Gene tham chiếu được sử dụng trong phân tích qRT-PCR là *SAC1* (Actin); WT: Cây không chuyển gene; TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10: Các dòng chuyển gene thuộc thể hệ TG1. Các ký hiệu * phía trên các cột biểu đồ biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Các cột biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, và các thanh trên cột biểu đồ biểu thị độ lệch chuẩn (SD). Các chấm biểu thị các mẫu riêng lẻ; $n = 3$.

Kết quả phân tích hàm lượng proline ở điều kiện xử lý stress mạn, 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).



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

(A) Hàm lượng proline của các dòng chuyển gene so với cây WT trong điều kiện không xử lý và xử lý stress mạn ($p < 0,05$); (B, C) Hàm lượng proline trong các dòng chuyển gene TG1-5 và TG1-10 ở điều kiện xử lý stress mạn và điều kiện không xử lý ($p < 0,05$). WT: Cây kiểu hoang dã, không chuyển gene; TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10: Các dòng chuyển gene thuộc thể hệ TG1. Các ký hiệu * phía trên các cột của biểu đồ biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Các cột biểu đồ biểu thị giá trị trung bình, và các thanh trên cột biểu thị độ lệch chuẩn hình học (SD). Các chấm biểu thị các mẫu riêng lẻ; $n = 3$.

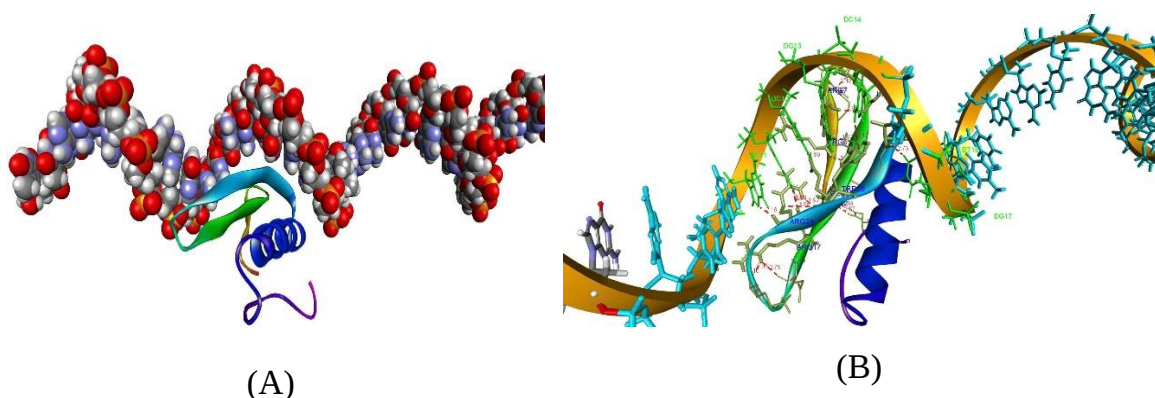
Mức độ tích lũy proline ở các dòng chuyển gene cao hơn rõ rệt so với cây WT; trong một số trường hợp, mức tăng đạt tới 267,03% (Hình 3.21B, 3.21C). Trong số các dòng được khảo sát, TG1-5 và TG1-10 thể hiện hàm lượng proline cao nhất khi xử lý mặn, lần lượt đạt $7,37 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ và $6,89 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các Hình 3.21B và 3.21C thể hiện rõ sự chênh lệch về hàm lượng proline giữa điều kiện xử lý và không xử lý stress mặn ở hai dòng TG1-5 và TG1-10, trong đó cả hai dòng đều cho thấy sự gia tăng đáng kể lượng proline khi chịu stress mặn.

Những kết quả này cho thấy rằng 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*

Nhằm làm rõ khả năng tương tác phân tử giữa miền AP2 của protein DREB7 và vùng promoter của gene *GmP5CS*, nghiên cứu đã tiến hành phân tích docking phân tử. Miền AP2 của protein DREB7 có chiều dài 59 amino acid, trong đó 11 amino acid bảo tồn cao được xác định là các vị trí tham gia trực tiếp vào liên kết với DNA và quyết định tính đặc hiệu của quá trình nhận diện trình tự đích. Phân tích vùng promoter của gene *GmP5CS* cho thấy sự hiện diện của nhiều motif điều hoà *cis* quan trọng, bao gồm DRE/CRT, ABRE và GT-1 những yếu tố đã được chứng minh có liên quan mật thiết đến cơ chế điều hoà đáp ứng của thực vật trước các stress phi sinh học, đặc biệt là stress hạn và mặn (Bảng 2.2). Các motif này được xem là các vị trí tiềm năng cho sự gắn kết của các nhân tố phiên mã thuộc phân họ *DREB*. Mô hình dự đoán tương tác giữa miền AP2 của protein DREB7 và vùng promoter của gene *GmP5CS* được trình bày ở Hình 3.22, qua đó cung cấp bằng chứng tin sinh học hỗ trợ cho giả thuyết rằng DREB7 có thể trực tiếp tham gia điều hoà phiên mã gene *GmP5CS* thông qua sự nhận diện và liên kết với các motif *cis* đặc hiệu trong vùng promoter.

Các liên kết hydrogen đóng vai trò then chốt trong việc quyết định ái lực liên kết và tính đặc hiệu của tương tác giữa miền AP2 và DNA. Như thể hiện ở Hình 3.22B, các amino acid tham gia trực tiếp vào liên kết DNA trong miền AP2 của protein DREB7, bao gồm Arg2, Gly3, Arg5, Arg7, Trp9, Lys11, Glu15, Arg17, Arg24, Trp26 và Thr29 đã hình thành các liên kết H với các nucleotide thuộc vùng promoter của gene *GmP5CS*. Các nucleotide này nằm trong các mô típ điều hòa *cis*, chủ yếu là DRE/CRT và GT-1, bao gồm DG10, DC11, DC12, DG13, DC14, DT16 và DG17. Những tương tác này cho thấy miền AP2 của DREB7 có khả năng nhận diện và gắn kết đặc hiệu với các trình tự promoter của gene *GmP5CS*.



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

(A) Mô hình tương tác được xếp hạng cao nhất dựa trên điểm HADDOCK cho thấy các motif được bảo tồn của AP2 tương tác với DNA. (B) Mạng lưới liên kết H giữa các vị trí amino acid của vùng AP2 và các rãnh chính và rãnh phụ của DNA đích. Các vùng xoắn α và tấm β của AP2 được hiển thị lần lượt bằng màu xanh đậm và xanh nhạt, chuỗi xoắn kép DNA được tô màu cam.

Các giá trị về docking phân tử được trình bày trong Bảng 3.4. Giá trị năng lượng liên kết trung bình âm lớn ($-83,8 \pm 6,2$ kcal/mol) phản ánh ái lực liên kết mạnh giữa miền AP2 của protein DREB7 và vùng promoter của gene *GmP5CS*. Độ lệch chuẩn tương đối nhỏ ($\pm 6,2$ kcal/mol) cho thấy tính ổn định cao của năng lượng liên kết giữa các cấu hình docking được dự đoán. Bên cạnh đó, năng lượng Van der Waals đạt giá trị $-35,5 \pm 9,6$ kcal/mol, cho thấy các tương tác không cộng hóa trị thuận lợi, góp phần đáng kể vào độ bền của phức hợp protein - DNA.

Bảng 3.4. Các giá trị docking phân tử của phức hợp AP2 - GmP5CS

Các giá trị docking	AP2-GmP5CS
Năng lượng liên kết (kcal/mol)	-83,8 ± - 6,2
RMSD (Å)	6,0 ± 0,1
Năng lượng Van der Waals (kcal/mol)	-35,5 ± 9,6
Năng lượng tĩnh điện (kcal/mol)	-331,6 ± -24,4
Năng lượng loại bỏ dung môi (kcal/mol)	11,2 ± 1,0
Năng lượng vi phạm hạn chế (kcal/mol)	68,1 ± 25,9
Diện tích bề mặt bị che lấp (Å ²)	1267,2 ± 71,6
Điểm Z	-2,2

Ngoài ra, diện tích bề mặt bị che lấp lớn ($1267,2 \pm 71,6 \text{ Å}^2$) phản ánh mức độ tiếp xúc đáng kể giữa miền AP2 và DNA, qua đó hỗ trợ cho sự gắn kết bền vững và ổn định của phức hợp. Giá trị độ lệch bình phương gốc (RMSD) đạt $6,0 \pm 0,1 \text{ Å}$, cho thấy các cấu hình docking thu được nằm gần trạng thái có năng lượng thấp nhất, đồng thời độ lệch chuẩn rất nhỏ ($\pm 0,1 \text{ Å}$) phản ánh độ nhất quán cao về cấu trúc giữa các mô hình dự đoán. Thêm vào đó, Điểm Z âm (-2,2) cho thấy năng lượng liên kết của phức hợp AP2 - DNA thấp hơn đáng kể so với các mô hình tương tác ngẫu nhiên, qua đó củng cố ý nghĩa thống kê và tính đặc hiệu sinh học của tương tác được dự đoán. Kết quả phân tích docking phân tử *in silico* cho thấy miền AP2 của protein DREB7 có khả năng liên kết đặc hiệu và ổn định với vùng promoter của gene *GmP5CS*, hỗ trợ cho vai trò điều hòa trực tiếp của DREB7 đối với gene *GmP5CS* trong đáp ứng stress mặn ở cây đậu tương.

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

3.3.4.1. Phân tích khả năng chịu hạn và chịu mặn của các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1

Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn và chịu mặn của các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 so với cây WT được trình bày chi tiết trong Bảng 3.5.

Tất cả các dòng chuyển gene được khảo sát (TG1-2, TG1-5, TG1-7 và TG1-10) đều thể hiện khả năng thích nghi tốt hơn dưới điều kiện stress mặn và hạn so với cây WT. Sự khác biệt này được thể hiện thông qua tỷ lệ cây héo, tỷ lệ cây chết, hàm lượng proline tích lũy, cũng như chỉ số chịu hạn và chịu mặn tương đối.

Dưới điều kiện stress hạn, sau 05 ngày xử lý, cây WT ghi nhận tỷ lệ cây héo và cây chết lần lượt là 25 và 5%. Ngược lại, các dòng chuyển gene chỉ ghi nhận tỷ lệ cây héo dao động từ 5 - 20% và tỷ lệ cây chết từ 0 - 5%, thấp hơn rõ rệt so với cây WT. Đáng chú ý, hai dòng TG1-5 và TG1-10 không ghi nhận cây chết tại thời điểm này. Khi thời gian xử lý kéo dài đến 09 ngày, mức độ tổn thương ở cây WT tiếp tục gia tăng, với 45% cây héo và 25% cây chết. Trong khi đó, các dòng chuyển gene vẫn duy trì tỷ lệ cây chết ở mức thấp hơn, trong đó dòng TG1-5 có tỷ lệ cây chết thấp nhất (10%), tiếp theo là dòng TG1-2 và dòng TG1-10 (mỗi dòng 15%), cho thấy khả năng duy trì sinh trưởng và sống sót tốt hơn trong điều kiện thiếu nước kéo dài.

Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận dưới điều kiện stress mặn. Sau 09 ngày xử lý, cây WT ghi nhận 35% cây héo và 25% cây chết, trong khi các dòng chuyển gene chỉ ghi nhận tỷ lệ cây chết dao động từ 15 - 20%. Đặc biệt, hai dòng TG1-5 và TG1-10 tiếp tục thể hiện ưu thế rõ rệt, với tỷ lệ cây chết chỉ ở mức 15%, thấp hơn đáng kể so với cây WT. Những kết quả này phản ánh khả năng thích ứng và chống chịu tốt hơn của các dòng đậu tương chuyển gene trước điều kiện stress mặn.

Song song với các chỉ tiêu hình thái, hàm lượng proline, một chỉ thị sinh hóa quan trọng liên quan trực tiếp đến cơ chế chống chịu stress, tăng rõ rệt ở các dòng đậu tương chuyển gene so với cây WT. Trong điều kiện sinh trưởng bình thường, hàm lượng proline ở các dòng TG1 cao hơn cây WT. Khi cây được xử lý stress hạn và mặn, đặc biệt sau 09 ngày xử lý, mức độ tích lũy proline ở các dòng chuyển gene tăng mạnh, trong đó TG1-5 và TG1-10 đạt giá trị cao nhất, dao động trong khoảng từ 5,86 - 7,37 $\mu\text{mol/g}$, vượt trội so với cây WT (2,76 $\mu\text{mol/g}$). Kết quả này cho thấy gene *GmDREB7* có vai trò thúc đẩy quá trình tích lũy proline, qua đó góp phần bảo vệ cấu trúc tế bào và duy trì cân bằng thẩm thấu nội bào trong điều kiện stress.

Bảng 3.5. So sánh khả năng chịu hạn, chịu mặn của các dòng chuyển gene và WT

WT và các dòng chuyển gene	Tỉ lệ cây héo sau 5 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Tỉ lệ cây chết sau 5 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Tỉ lệ cây héo sau 7 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Tỉ lệ cây chết sau 7 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Tỉ lệ cây héo sau 9 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Tỉ lệ cây chết sau 9 ngày xử lý hạn, mặn n=10	Hàm lượng proline ở điều kiện thường ($\mu\text{mol/g}$)	Hàm lượng proline sau 5 ngày xử lý hạn, mặn ($\mu\text{mol/g}$)	Hàm lượng proline sau 9 ngày xử lý hạn, mặn ($\mu\text{mol/g}$)	Chỉ số chịu hạn, chịu mặn tương đối
Khả năng chịu hạn										
WT	0,25	0,05	0,35	0,15	0,45	0,25	2,04	2,15	2,76	3,797
TG1-2	0,15	0,05	0,25	0,05	0,20	0,15	2,28	2,88	3,43	5,606
TG1-5	0,05	0	0,15	0	0,30	0,10	2,76	4,15	5,86	11,717
TG1-7	0,20	0,05	0,30	0,10	0,40	0,20	3,25	3,55	4,16	9,022
TG1-10	0,10	0	0,20	0,10	0,35	0,15	3,64	5,72	5,87	17,919
Khả năng chịu mặn										
WT	0,20	0,15	0,30	0,15	0,35	0,25	2,04	2,15	2,76	3,752
TG1-2	0,15	0,10	0,20	0,10	0,30	0,15	2,28	2,32	3,76	4,838
TG1-5	0,10	0,05	0,15	0,10	0,20	0,15	2,76	6,32	7,37	20,992
TG1-7	0,15	0,10	0,25	0,15	0,30	0,20	3,25	3,34	3,83	8,067
TG1-10	0,10	0,15	0,20	0,15	0,25	0,15	3,64	5,26	6,88	18,260

Ghi chú: Đơn vị tính tỷ lệ cây héo và tỷ lệ cây chết được biểu diễn bằng số thập phân

Kết quả tổng hợp các chỉ tiêu sinh lý và hình thái, bao gồm tỷ lệ cây héo, tỷ lệ cây chết và hàm lượng proline tại các thời điểm 5, 7 và 9 ngày sau xử lý stress cho thấy các dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1 đều có chỉ số chịu hạn và chịu mặn tương đối cao hơn so với cây đối chứng WT. Cụ thể, chỉ số chịu hạn của các dòng chuyển gene tăng từ 1,48 - 4,72 lần, trong khi chỉ số chịu mặn tăng từ 1,29 - 4,87 lần so với WT. Trong số các dòng được khảo sát, dòng TG1-10 thể hiện khả năng chống chịu nổi bật nhất với chỉ số chịu hạn và chịu mặn lần lượt đạt 17,919 và

18,260. Dòng TG1-5 cũng cho kết quả cao, với giá trị tương ứng đạt 11,717 và 20,992. Ngược lại, dòng TG1-2 có chỉ số chống chịu thấp nhất trong nhóm chuyển gene, mặc dù vẫn vượt cây WT.

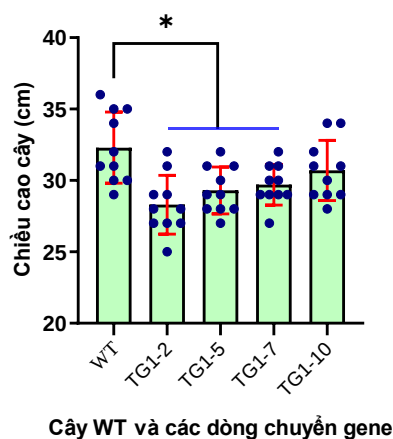
Kết quả này cho thấy sự biểu hiện tăng cường của gene *GmDREB7* đã góp phần nâng cao khả năng chịu hạn và chịu mặn của các dòng đậu tương chuyển gene. Trong đó, hai dòng TG1-5 và TG1-10 thể hiện tiềm năng nổi bật, là những ứng viên triển vọng để tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu và khai thác trong chương trình chọn giống đậu tương chịu stress phi sinh học.

3.3.4.2. Đặc điểm hình thái và hóa sinh hạt của hạt ở một số dòng đậu tương chuyển gene thế hệ TG1

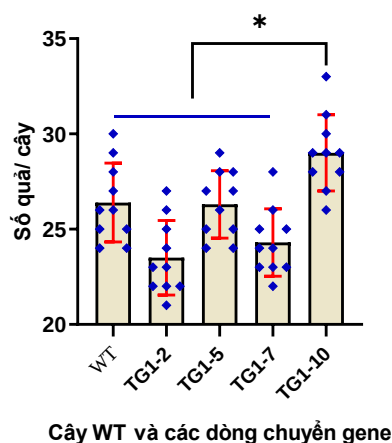
Kết quả phân tích các chỉ tiêu hình thái, sinh hóa và sinh lý của các dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7* (Bảng 3.6 và Hình 3.23) cho thấy, các dòng chuyển gene không xuất hiện sự sai khác đáng kể về đặc điểm sinh trưởng và chất lượng hạt so với cây WT. Việc chuyển gene không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính nông sinh học cơ bản của cây đậu tương.

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 chắc/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; $p < 0,05$).

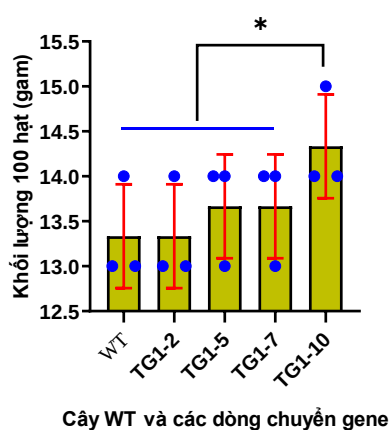
Về chỉ tiêu năng suất hạt, khối lượng 100 hạt của các dòng chuyển gene dao động trong khoảng từ 14,33 - 15,66 g và không khác biệt so với cây WT. Kết quả này cho thấy quá trình chuyển gene không ảnh hưởng đến kích thước và khối lượng hạt, qua đó khẳng định tính ổn định về mặt nông học của các dòng đậu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



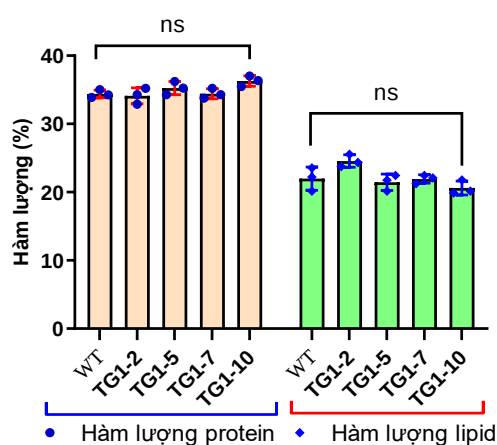
(A)



(B)



(C)



(D)

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 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 $\mu\text{mol/g}$).

Bảng 3.6. Đặc điểm của một số dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7*

Đặc điểm	WT	TG1-2	TG1-5	TG1-7	TG1-10
Chiều cao cây; n=10	32,30 ^c	28,20 ^a	29,70 ^{ab}	28,70 ^a	30,70 ^{bc}
Số quả chắc/cây; n=10	26,40 ^b	23,50 ^a	26,30 ^b	24,30 ^a	29,00 ^c
Khối lượng 100 hạt (g); n=3	14,33 ^a	15,00 ^a	14,33 ^a	14,33 ^a	15,66 ^a
Hàm lượng protein (%); n=3	34,38 ^a	34,12 ^a	35,24 ^{ab}	34,43 ^a	36,28 ^b
Hàm lượng lipid; n=3	21,98 ^a	24,55 ^b	21,45 ^a	21,93 ^a	20,61 ^a
Hàm lượng proline sau 5 ngày stress hạn ($\mu\text{mol/g}$); n=3	2,15 ^a	2,88 ^b	4,15 ^d	3,55 ^c	5,72 ^e
Hàm lượng proline sau 9 ngày stress hạn ($\mu\text{mol/g}$); n=3	2,76 ^a	3,43 ^b	5,86 ^d	4,16 ^c	5,87 ^d
Hàm lượng proline sau 5 ngày stress mặn ($\mu\text{mol/g}$); n=3	2,15 ^a	2,32 ^a	6,32 ^d	3,34 ^b	5,26 ^c
Hàm lượng proline sau 9 ngày stress mặn ($\mu\text{mol/g}$); n=3	2,76 ^a	3,76 ^b	7,37 ^d	3,83 ^b	6,88 ^c
Chỉ số chịu hạn tương đối	3,797	5,606	11,717	9,022	17,919
Chỉ số chịu mặn tương đối	3,752	4,838	20,992	8,067	18,260

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một dòng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Sự gia tăng tích lũy proline ở các dòng chuyển gene tương ứng với sự cải thiện rõ rệt các chỉ số chịu hạn và chịu mặn tương đối. Trong đó, dòng TG1-10 thể hiện khả năng thích nghi vượt trội nhất, với chỉ số chịu hạn và chịu mặn lần lượt đạt 17,919 và 18,260, cao hơn đáng kể so với cây WT. Dòng TG1-5 cũng cho thấy tiềm

năng nổi bật, với chỉ số chịu hạn đạt 11,717 và chỉ số chịu mặn đạt 20,992. Các dòng TG1-2 và TG1-7 có mức cải thiện trung bình, trong khi cây WT luôn ghi nhận giá trị thấp nhất ở hầu hết các chỉ tiêu liên quan đến đáp ứng stress.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các dòng đậu tương chuyển gene thể hệ TG1 vẫn duy trì ổn định các đặc điểm hình thái, năng suất và thành phần hóa sinh của hạt, chứng tỏ gene chuyển đã được di truyền và biểu hiện tương đối ổn định ở thế hệ đầu sau biến nạp. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong chọn tạo giống, bởi một cấu trúc chuyển gene hiệu quả không chỉ giúp tăng cường khả năng chống chịu stress phi sinh học mà còn cần đảm bảo duy trì các đặc tính nông học và chất lượng hạt của giống. Kết quả thu được phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây về đậu tương chuyển gene mang các gene thuộc phân họ DREB. Chẳng hạn, khi chuyển gene *GmDREB6* vào giống đậu tương ĐT22, các cây chuyển gene T0 sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới và không ghi nhận các biến đổi bất thường về hình thái [82]. Tương tự, trong nghiên cứu hiện tại, các dòng TG1 mang gene *GmDREB7* vẫn duy trì ổn định các chỉ tiêu nông học quan trọng như chiều cao cây, số quả/chắc/cây và khối lượng 100 hạt so với cây đối chứng WT. Những kết quả này cho thấy việc biểu hiện gene *GmDREB7* có tiềm năng cải thiện khả năng chống chịu stress mặn mà không gây tác động bất lợi đáng kể đến các đặc điểm nông học cơ bản của cây đậu tương.

Như vậy, việc chuyển gene *GmDREB7* không gây biến đổi bất lợi về hình thái, năng suất và chất lượng hạt của cây đậu tương, đồng thời góp phần nâng cao đáng kể khả năng thích nghi sinh lý của cây dưới điều kiện stress hạn và mặn thông qua cơ chế tích lũy proline. Trong số các dòng được khảo sát, TG1-10 và TG1-5 được đánh giá là hai dòng triển vọng nhất, phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo về khả năng chống chịu stress, tính ổn định di truyền và tiềm năng ứng dụng trong chọn tạo giống đậu tương chịu hạn và chịu mặn.

3.3.5. Thảo luận kết quả

Ở cây đậu tương, nhiều gene như *GmDREB1*, *GmDREB2* và *GmDREB6* đã được xác định tham gia tích cực vào cơ chế đáp ứng với stress lạnh, hạn và mặn thông qua điều hòa biểu hiện các gene cảm ứng stress. Tuy nhiên, chức năng sinh học của *GmDREB7* vẫn chưa được làm sáng tỏ một cách đầy đủ. Các nghiên cứu

trên cây thuốc lá chuyển gene cho thấy việc biểu hiện quá mức *GmDREB7* trong điều kiện mặn có thể làm giảm mức phiên mã của các gene đáp ứng stress như *RD29A* và *SODFe* [83], cho thấy khả năng điều hòa âm và sự phụ thuộc vào bối cảnh sinh lý của hệ thống nghiên cứu. Do đó, việc phân tích chức năng của *GmDREB7* trực tiếp trên cây đậu tương là cần thiết nhằm làm rõ cơ chế điều hòa và đánh giá chính xác tiềm năng ứng dụng của gene *GmDREB7* trong cải thiện tính chống chịu stress.

Trong nghiên cứu này, *GmDREB7* được khảo sát ở các dòng đậu tương chuyển gene trong điều kiện sinh trưởng bình thường và stress mặn (NaCl 250 mM). Kết quả phân tích qRT-PCR cho thấy mức phiên mã của *GmDREB7* tăng rõ rệt ở các dòng chuyển gene so với cây WT khi xử lý mặn, đặc biệt hai dòng TG1-5 và TG1-10, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Xu hướng này phù hợp với các báo cáo trước đây về sự cảm ứng mạnh của các gene *GmDREB2* và *GmDREB6* dưới điều kiện stress hạn và mặn [82], [88], [109] đồng thời cho thấy *GmDREB7* cũng là một thành viên tham gia tích cực vào mạng lưới đáp ứng stress ở đậu tương.

Một trong những cơ chế sinh lý quan trọng giúp thực vật thích nghi với stress mặn là sự tích lũy proline, một hợp chất vừa đóng vai trò điều hòa thẩm thấu vừa tham gia bảo vệ tế bào trước stress oxy hóa. Enzyme P5CS giữ vai trò then chốt trong con đường sinh tổng hợp proline và thường được hoạt hóa mạnh dưới điều kiện stress [68], [116]. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức phiên mã của *GmP5CS* ở hai dòng TG1-5 và TG1-10 tăng đáng kể khi xử lý mặn, cao hơn cây WT từ 135,29 - 211,35% ($P < 0,05$). Sự gia tăng biểu hiện này tương ứng với hàm lượng proline tích lũy trong tế bào, vốn cao hơn cây WT từ 136,59 - 267,03%. Những dữ liệu này cho thấy *GmDREB7* có liên quan mật thiết đến việc kích hoạt con đường sinh tổng hợp proline, qua đó góp phần nâng cao khả năng chịu mặn của cây đậu tương chuyển gene. Kết quả thu được phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây trên các loài cây trồng khác như khoai tây, đậu cô ve và đậu tương, trong đó sự gia tăng biểu hiện *P5CS* thường đi kèm với tích lũy proline và cải thiện khả năng chống chịu stress [5], [18], [82], [88]. Tuy nhiên, điểm mới quan trọng của nghiên

cứu này là việc làm rõ vai trò điều hòa của *GmDREB7* trực tiếp trên cây đậu tương. Sự gia tăng đồng thời mức phiên mã *GmDREB7*, *GmP5CS* và hàm lượng proline gợi ý mối quan hệ điều hòa trực tiếp giữa nhân tố phiên mã này và gene mục tiêu trong con đường sinh tổng hợp proline.

Về mặt cơ chế, *GmDREB7* có khả năng nhận diện và gắn kết với các motif *cis* như GCC và GT-1 trong vùng promoter của *GmP5CS*. Miền AP2 của protein *GmDREB7* chứa trình tự giàu các amino acid mang điện tích dương (điển hình là RGRRSKERRWT), giàu arginine và lysine, vốn được xem là yếu tố quyết định khả năng tương tác với DNA của nhiều protein thuộc họ ERF. Mặc dù các *DREB* thường nhận diện motif DRE/CRT nhưng ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy chúng cũng có thể tương tác với motif GCC, đặc biệt trong promoter của các gene cảm ứng stress ở cây họ đậu.

Phân tích docking phân tử *in silico* trong nghiên cứu này đã củng cố giả thuyết trên 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 ở các dòng chuyển gene.

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

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

Tiếp tục đánh giá hai dòng đậu tương TG1-5 và TG1-10 ở các thế 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.

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.

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 Yến, 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. Nguyen Thu Giang, Vu Trong Luong, Pham Thi Thu Hien, Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Duc Hung, Nguyen Huu Quan, Vi Thi Xuan Thuy, Nguyen Thi Hai Yen, Chu Hoang Mau (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 Yến, 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).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998), “*Phân lập gene và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*”, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội, 80-82.
2. Nguyễn Văn Mùi (2001), “*Thực hành hóa sinh*”, NXB NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội, 66-91.
3. Trần Thị Trường (2010), “*Quy trình kỹ thuật sản xuất giống đậu tương ĐT26*”, Tạp chí khoa học và công nghệ nông nghiệp Việt Nam, Số 08 (chuyên đề), 40-42.

Tiếng Anh

4. Agarwal, P. K., Gupta, K., Lopato, S., & Agarwal, P. (2017), Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 68(9), 2135-2148.
5. Aïda HS, Radhia GB, Bidani A, Jaoua L, Savouré A, Jaoua S (2005), “Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants”, *Plant Sci*, 169(4), 746–52.
6. Alamri, S., Hu, Y., Mukherjee, S., Aftab, T., Fahad, S., Raza, A., ... & Siddiqui, M. H. (2020), Silicon-induced postponement of leaf senescence is accompanied by modulation of antioxidative defense and ion homeostasis in mustard (*Brassica juncea*) seedlings exposed to salinity and drought stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 47-59.
7. Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M. (1998), A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA, *EMBO J*, 17: 5484-96.
8. An, J., Cheng, C., Hu, Z., Chen, H., Cai, W., & Yu, B. (2018), The *Panax ginseng* PgTIP1 gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic soybean plants by maintaining homeostasis of water, salt ions and ROS, *Environmental and experimental botany*, 155, 45-55.

9. Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2021), Current progress and challenges in crop genetic transformation, *Journal of Plant Physiology*, 261, 153411.
10. Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., ... & Waterhouse, P. M. (2018), The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons, *Annual review of phytopathology*, 56(1), 405-426.
11. Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973), Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39,205-7.
12. Bhatnagar-Mathur P., Devi M.J., Reddy D.S., Vadez V., Yamaguchi Shinozaki K., Sharma K.K. (2006), Over-expression of Arabidopsis thaliana DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) for improving tolerance to drought stress (poster presentation), In: Sackler AM, ed. *Colloquia on 'From functional geneomics of model organisms to crop plants for global health*, Washington: DC. National Academy of Sciences, 3-5.
13. Cadavid, I. C., Guzman, F., de Oliveira-Busatto, L., de Almeida, R. M., & Margis, R. (2020), Transcriptional analyses of two soybean cultivars under salt stress, *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2871-2888.
14. Cannon, S. B., & Shoemaker, R. C. (2012), Evolutionary and comparative analyses of the soybean genome, *Breeding Science*, 61(5), 437- 444.
15. Cao, Y., Luo, Q., Tian, Y., & Meng, F. (2017), Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots, *BMC plant biology*, 17(1), 53.
16. Charlson D.V., Hu X., Okimoto B., Purcell L.C. (2009), Glycine max cultivar Jackson drought responsive element binding protein 1 (DREB1), NCBI.
17. Chen, H., Wang, J., Cui, J., Wang, C., Liang, S., Liu, H., & Wen, J. (2019), Negative regulation of bleomycins biosynthesis by ArsR/SmtB family repressor BlmR in *Streptomyces verticillus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(16), 6629-6644.
18. Chen, J. B., Wang, S. M., Jing, R. L., & Mao, X. G. (2009), Cloning the Pvp5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses, *Journal of Plant Physiology*, 166(1), 12-19.

19. Chen, M., Wang, Q. Y., Cheng, X. G., Xu, Z. S., Li, L. C., Ye, X. G., ... & Ma, Y. Z. (2007), GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 353(2), 299-305.
20. Chen M., Ma Y., Xu Z., Li L., Wang Q. (2007), Glycine max dehydration-responsive element binding protein 5 (DREB5) mRNA, complete cds, NCBI.
21. Chen M., Xu Z., Xia L., Li L., Cheng X., Dong J., Wang Q., Ma Y. (2009b), 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.
22. Chen Y., Chen P. and de los Reyes B.G. (2004), Analysis of the expression of DREB1 gene orthologs in cultivated and wild species of soybean, NCBI.
23. Chen, H., Liu, L., Wang, L., Wang, S., & Cheng, X. (2016), VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*, *Journal of plant research*, 129, 263-273.
24. Chen, L., Cai, Y., Liu, X., Yao, W., Guo, C., Sun, S., ... & Hou, W. (2018), Improvement of soybean *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by adding glutamine and asparagine into the culture media, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3039.
25. Chen, Y., Li, Z., Sun, T., Wang, D., Wang, Z., Zhang, C., ... & Su, Y. (2022), Sugarcane ScDREB2B-1 confers drought stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* by regulating the ABA signal, ROS level and stress-related gene expression, *International journal of molecular sciences*, 23(17), 9557.
26. Chu MH, Nguyen TVT, Nguyen HH, Nguyen NTB, Chu LH (2016), Glycine max cv. Xanhtiendai partial mRNA for drought responsive element binding protein 5 (DREB5 gene), GenBank: FR822737.1.
27. Corona, R. I., Sudarshan, S., Aluru, S., & Guo, J. T. (2018), An SVM-based method for assessment of transcription factor-DNA complex models, *BMC bioinformatics*, 19, 506.

28. Dao XT, Ho MT, Vu TTT, Le VS, Chu HM (2015), Cloning and overexpression of GmDREB2 gene from a Vietnamese drought-resistant Soybean variety, *Braz. Arch. Biol Technol*, 58, 651-657.
29. Dawood, M. F., Zaid, A., & Latef, A. A. H. A. (2022), Salicylic acid spraying-induced resilience strategies against the damaging impacts of drought and/or salinity stress in two varieties of *Vicia faba* L. seedlings, *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(5), 1919-1942.
30. Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993), Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *The plant journal*, 4(2), 215-223.
31. Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X., & Xie, F. (2020), Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean, *Agronomy*, 10(2), 302.
32. Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003), OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression, *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.
33. Felsenstein J. (1985), Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, vol. 39, 783-791.
34. Feng, C., Gao, H., Zhou, Y., Jing, Y., Li, S., Yan, Z., ... & Li, H. (2023), Unfolding molecular switches for salt stress resilience in soybean: recent advances and prospects for salt-tolerant smart plant production, *Frontiers in plant science*, 14, 1162014.
35. Feng, K., Hou, X. L., Xing, G. M., Liu, J. X., Duan, A. Q., Xu, Z. S., ... & Xiong, A. S. (2020), Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant, *Critical reviews in biotechnology*, 40(6), 750-776.
36. Ganesan, K., & Xu, B. (2017), A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans, *Nutrients*, 9(5), 455.
37. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010), Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.

38. Gromiha, M. M., & Harini, K. (2025), Protein-nucleic acid complexes: Docking and binding affinity, *Current Opinion in Structural Biology*, 90, 102955.
39. Gutha, L. R., & Reddy, A. R. (2008), Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance, *Plant molecular biology*, 68(6), 533-555.
40. Hamza, M., Basit, A. W., Shehzadi, I., Tufail, U., Hassan, A., Hussain, T., ... & Hayat, H. M. (2024), Global impact of soybean production: A review, *Asian J. Biochem. Genet. Mol. Biol*, 16, 12-20.
41. Han, L., Ma, K., Zhao, Y., Mei, C., Mamat, A., Wang, J., ... & He, T. (2022), The cold-stress responsive gene DREB1A involved in low-temperature tolerance in Xinjiang wild walnut, *PeerJ*, 10, e14021.
42. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012), Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform*, 4(1), 17.
43. Hassan, S., Berk, K., & Aronsson, H. (2021), Evolution and identification of DREB transcription factors in the wheat genome: modeling, docking and simulation of DREB proteins associated with salt stress, *J Biomol Struct Dyn*, 40(16), 7191–7204.
44. Hou, Z., Li, Y., Cheng, Y., Li, W., Li, T., Du, H., ... & Cheng, Q. (2022), Genome-wide analysis of DREB genes identifies a novel salt tolerance gene in wild soybean (*Glycine soja*), *Frontiers in Plant Science*, 13, 821647.
45. Huang, S., Ma, Z., Hu, L., Huang, K., Zhang, M., Zhang, S., ... & Du, X. (2021), Involvement of rice transcription factor OsERF19 in response to ABA and salt stress responses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 22-30.
46. Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi Shinozaki K. (2006), Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice, *Plant Cell Physiol*, 47, 141-153.

47. Jarambasa, T., Regon, P., Jyoti, S. Y., Gupta, D., Panda, S. K., & Tanti, B. (2023), Genome-wide identification and expression analysis of the *Pisum sativum* (L.) APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) gene family reveals functions in drought and cold stresses, *Genetica*, 151(3), 225-239.
48. Jiang, Q., Sun, X., Niu, F., Hu, Z., Chen, R., & Zhang, H. (2017), GmDREB1 overexpression affects the expression of microRNAs in GM wheat seeds, *PLoS one*, 12(5), e0175924.
49. Jofuku, K. D., Den Boer, B. G., Van Montagu, M., & Okamoto, J. K. (1994), Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2, *The Plant Cell*, 6(9), 1211-1225.
50. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021), Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, 596(7873), 583-589.
51. Kar, M. M., & Raichaudhuri, A. (2021), Overview of Arabidopsis as a genetics model system and its limitation, leading to the development of emerging plant model systems, *In Model Organisms in Plant Genetics*. IntechOpen.
52. Kidokoro, S., Watanabe, K., Ohori, T., Moriwaki, T., Maruyama, K., Mizoi, J., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015), Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression, *Plant J*, 81(3), 505-518.
53. Kim, I. S., Kim, C. H., & Yang, W. S. (2021), Physiologically active molecules and functional properties of soybeans in human health - A current perspective, *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4054.
54. Kong, L., Song, Q., Wei, H., Wang, Y., Lin, M., Sun, K., ... & Luo, K. (2023), The AP2/ERF transcription factor PtoERF15 confers drought tolerance via JA-mediated signaling in *Populus*, *New Phytologist*, 240(5), 1848-1867.
55. Kumar, V., Kumar, A., Tewari, K., Garg, N. K., Changan, S. S., & Tyagi, A. (2022), Isolation and characterization of drought and ABA responsive promoter

- of a transcription factor encoding gene from rice, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(10), 1813-1831.
56. Laemmli UK (1970), Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680 - 685.
 57. Li, F., Ni, H., Yan, W., Xie, Y., Liu, X., Tan, X., ... & Zhang, S. H. (2021), Overexpression of an aquaporin protein from *Aspergillus glaucus* confers salt tolerance in transgenic soybean, *Transgenic Research*, 30(6), 727-737.
 58. Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., ... & Li, Y. (2017), Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean, *Frontiers in plant science*, 8, 246.
 59. Li, X., Liang, Y., Gao, B., Mijiti, M., Bozorov, T. A., Yang, H., ... & Wood, A. J. (2019), ScDREB10, an A-5c type of DREB gene of the desert moss *Syntrichia caninervis*, confers osmotic and salt tolerances to *Arabidopsis*, *Genes*, 10(2), 146.
 60. Liao, X., Guo, X., Wang, Q., Wang, Y., Zhao, D., Yao, L., ... & Li, T. (2017), Overexpression of Ms DREB 6.2 results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants, *The Plant Journal*, 89(3), 510-526.
 61. Linh, N. T., & Thang, V. N. (2021), Effects of salinity stress on the growth, physiology, and yield of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 4(2), 1043-1055.
 62. Liu, C., Chen, Q., Qu, Y., Cui, X., & Ge, F. (2025), The plant platform for natural products synthesis: Tobacco, *Industrial Crops and Products*, 225, 120605.
 63. Liu, J., Yang, R., Liang, Y., Wang, Y., & Li, X. (2022), The DREB A-5 transcription factor ScDREB5 from *Syntrichia caninervis* enhanced salt tolerance by regulating jasmonic acid biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*, 13, 857396.
 64. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998), Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction

- pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 10(8), 1391-1406.
65. Liu, T., Ye, X., Li, M., Li, J., Qi, H., & Hu, X. (2020), H₂O₂ and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants, *Environmental and Experimental Botany*, 171, 103961.
 66. Livak KJ, Schmittgen TD (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25, 402-428.
 67. Lo, T. S., Le, H. D., Nguyen, V. T. T., Chu, H. H., Le, V. S., & Chu, H. M. (2015), Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco, *Turkish Journal of Botany*, 39(6), 988-995.
 68. Luan Y, An H, Chen Z, Zhao D, Tao J (2024), Functional Characterization of the *Paeonia ostii* P5CS Gene under Drought Stress, *Plants*, 13(15), 2145.
 69. Lu, L., Wei, W., Tao, J. J., Lu, X., Bian, X. H., Hu, Y., ... & Zhang, J. S. (2021), Nuclear factor Y subunit GmNFYA competes with GmHDA13 for interaction with GmFVE to positively regulate salt tolerance in soybean, *Plant Biotechnology Journal*, 19(11), 2362-2379.
 70. Mao, L., Deng, M., Jiang, S., Zhu, H., Yang, Z., Yue, Y., & Zhao, K. (2020) Characterization of the DREBA4-type transcription factor (SlDREBA4), which contributes to heat tolerance in tomatoes, *Frontiers in Plant Science*, 11, 554520.
 71. Ministry of Agriculture and Rural Development (MARD) (2023), *Report on soybean production and consumption in Vietnam*, Department of Crop Production, Hanoi.
 72. Mizoi, J., Ohori, T., Moriwaki, T., Kidokoro, S., Todaka, D., Maruyama, K., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013), GmDREB2A;2, a canonical dehydration-responsive element-binding protein2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression, *Plant Physiol*, 161, 346-361.

73. Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012), AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96.
74. Molina-Hidalgo, F. J., Vazquez-Vilar, M., D'Andrea, L., Demurtas, O. C., Fraser, P., Giuliano, G., ... & Goossens, A. (2021), Engineering metabolism in *Nicotiana* species: a promising future, *Trends in Biotechnology*, 39(9), 901-913.
75. Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P., Lopato S. (2011), Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors, *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230–249.
76. Nakagawa, A. C., Itoyama, H., Ariyoshi, Y., Ario, N., Tomita, Y., Kondo, Y., ... & Ishibashi, Y. (2018), Drought stress during soybean seed filling affects storage compounds through regulation of lipid and protein metabolism, *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-8.
77. Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006), Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice, *Plant physiology*, 140(2), 411-432.
78. NCBI, “AP2 in *Glycine max*,” Gene [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=AP2+in+Glycine+max>.
79. NCBI, “Glycine max gene for dehydration-responsive element-binding protein,” Gene[Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glycine+max+gene+for+dehydration+responsive+element-binding+protein>.
80. NCBI, GenBank [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.
81. Nguyen, T. N. L., Vaciava, P., Nguyen, T. C., Nguyen, H. Q., Pham, T. T. N., Vu, T. T. T., & Chu, H. M. (2021), Characteristics and phylogeny of DREB gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill], *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering (VJSTE)*, 63, 60-64.
82. Nguyen, Q. H., Vu, L. T. K., Nguyen, L. T. N., Pham, N. T. T., Nguyen, Y. T. H., Le, S. V., & Chu, M. H. (2019), Overexpression of the GmDREB6 gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants, *Scientific reports*, 9(1), 19663.

83. Nguyen, Y. T. H., Tu, T. Q., Nguyen, N. H., Van Nguyen, D., Tran, H. T., Do, P. T., ... & Chu, M. H. (2023), A novel soybean transcription factor, DREB7, regulates RD29A and SODFe gene expression in transgenic tobacco plants, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 59(3), 275-284.
84. Oh S.J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.J., Kim M., Kim Y.K. (2005), Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgeneic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth, *Plant Physiol*, 138, 341-351.
85. Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995), Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element, *The Plant Cell*, 7(2), 173-182.
86. Olhoft, P. M., Donovan, C. M., & Somers, D. A. (2006), Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants, *Methods Mol Biol*, 343, 3859-6.
87. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004), UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J Comput Chem*, 25(13), 1605-12.
88. Pham, T. T. N., Nguyen, H. Q., Nguyen, T. N. L., Dao, X. T., Sy, D. T., Van Son, L., & Hoang Mau, C. (2020), Overexpression of the 'GmDREB2' gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants, *Australian Journal of Crop Science*, 14(3), 495-503.
89. Pour-Aboughadareh, A., Omid, M., Naghavi, M. R., Etminan, A., Mehrabi, A. A., & Poccai, P. (2020), Wild relatives of wheat respond well to water deficit stress: A comparative study of antioxidant enzyme activities and their encoding gene expression, *Agriculture*, 10(9), 415.
90. Qin F., Kakimoto M., Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Tran L.S.P., Shinozaki K. (2007), Yamaguchi-Shinozaki K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L, *Plant J*, 50, 54-69.
91. Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., ... & Mandzhieva, S. (2021), Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress, *Biology*, 10(4), 267.

92. Ren, M., Wang, Z., Xue, M., Wang, X., Zhang, F., Zhang, Y. U., ... & Wang, M. (2019), Constitutive expression of an A-5 subgroup member in the DREB transcription factor subfamily from *Ammopiptanthus mongolicus* enhanced abiotic stress tolerance and anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis*, *PLoS One*, 14(10), e0224296.
93. Ren, S., Lyle, C., Jiang, G. L., & Penumala, A. (2016), Soybean salt tolerance 1 (GmST1) reduces ROS production, enhances ABA sensitivity, and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 7, 445.
94. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., 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, *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), 998-1009.
95. Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006), Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression, *The Plant Cell*, 18(5), 1292-1309.
96. Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., ... & Jackson, S. A. (2010), Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature*, 463(7278), 178-183.
97. Sheteiwy, M. S., Shao, H., Qi, W., Daly, P., Sharma, A., Shaghaleh, H., ... & Lu, H. (2021), Seed priming and foliar application with jasmonic acid enhance salinity stress tolerance of soybean (*Glycine max* L.) seedlings, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 2027-2041.
98. Singh, G., Dukariya, G., & Kumar, A. (2020), Distribution, importance and diseases of soybean and common bean: A review, *Biotechnology Journal International*, 24(6), 86-98.
99. Singh, S., Chopperla, R., Shingote, P., Chhapekar, S. S., Deshmukh, R., Khan, S., ... & Solanke, A. U. (2021), Overexpression of EcDREB2A transcription factor from finger millet in tobacco enhances tolerance to heat stress through ROS scavenging, *Journal of Biotechnology*, 336, 10-24.

100. Singh, K., Jadhao, R. S., Maharana, J., Samal, K. C., Pradhan, S. K., & Rout, G. R. (2017), Structural investigation of Indica rice (*Oryza sativa* L.) DREB1AP2 domain in response to GCC-BOX DNA: an insight from molecular dynamics, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 54, 47-56.
101. Spiliotopoulos, D., Kastitis, P. L., Melquiond, A. S., Bonvin, A. M., Musco, G., Rocchia, W., & Spitaleri, A. (2016), dMM-PBSA: a new HADDOCK scoring function for protein-peptide docking, *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 46.
102. Staniak, M., Szpunar-Krok, E., & Kocira, A. (2023), Responses of soybean to selected abiotic stresses-Photoperiod, temperature and water, *Agriculture*, 13(1), 146.
103. Su, W., Xu, M., Radani, Y., & Yang, L. (2023), Technological development and application of plant genetic transformation, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10646.
104. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma, B., & Ezura, H. (2006), Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce, *FEBS Lett*, 580, 620-626.
105. Sun, S., Yu, J. P., Chen, F., Zhao, T. J., Fang, X. H., Li, Y. Q., & Sui, S. F. (2008), TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE-and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis, *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6261-6271.
106. Tamura, K., & Nei, M. (1993), Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
107. Tamura K., G. Stecher, and S. Kumar (2021), MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Mol. Biol. Evol*, vol. 38, 3022-3027.
108. Topping JF (1998), Tobacco Transformation. In: Foster, G.D., Taylor, S.C. (eds) Plant Virology Protocols, *Methods Mol*, 81.
109. Tu, T. Q., Vaciata, P., Lo, T. T. M., Nguyen, N. H., Pham, N. T. T., Nguyen, Q. H., ... & Chu, M. H. (2021), 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*, 28(12), 7175-7181.
110. Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020), Salt tolerance mechanisms of plants, *Annual review of plant biology*, 71(1), 403-433.
 111. Wang, H., Ni, D., Shen, J., Deng, S., Xuan, H., Wang, C., ... & Xing, H. (2022), Genome-wide identification of the AP2/ERF gene family and functional analysis of GmAP2/ERF144 for drought tolerance in soybean, *Frontiers in Plant Science*, 13, 848766.
 112. Wang, X., Wu, Z., Zhou, Q., Wang, X., Song, S., & Dong, S. (2022), Physiological response of soybean plants to water deficit, *Frontiers in Plant Science*, 12, 809692.
 113. Wang, Z., Yang, Y., Yadav, V., Zhao, W., He, Y., Zhang, X., & Wei, C. (2022), Drought-induced proline is mainly synthesized in leaves and transported to roots in watermelon under water deficit, *Horticultural Plant Journal*, 8(5), 615-626.
 114. Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1992), A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins, *Nucleic acids research*, 20(24), 6737.
 115. Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994), A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, *The Plant Cell*, 6(2), 251-264.
 116. Yan, L., Lu, M., Riaz, M., Tong, K., Yu, H., Gao, G., & Niu, Y. (2025), Exogenous proline enhances salt acclimation in soybean seedlings: Modifying physicochemical properties and controlling proline metabolism through the ornithine-glutamate dual pathway, *Ecotoxicology and environmental safety*, 294, 118012.
 117. Yang, B., Yao, X., Zeng, Y., & Zhang, C. (2022), Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of AP2/ERF superfamily genes under different development and abiotic stress conditions in pecan (*Carya illinoensis*), *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 2920.

118. Yang, D., Ni, R., Yang, S., Pu, Y., Qian, M., Yang, Y., & Yang, Y. (2021), Functional characterization of the *Stipa purpurea* P5CS gene under drought stress conditions, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9599.
119. Yang, X. F., Yu, X. Q., Zhou, Z., Ma, W. J., & Tang, G. X. (2016), A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.), *Acta physiologiae plantarum*, 38(3), 60.
120. Yu, S., Wang, C., Wang, Q., Sun, Q., Zhang, Y., Dong, J., ... & Yu, G. (2023), Identification and analysis of SOD family genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and their potential roles in stress responses, *Agronomy*, 13(8), 1959.
121. Yu, Y., Yu, M., Zhang, S., Song, T., Zhang, M., Zhou, H., ... & Zhang, X. (2022), Transcriptomic identification of wheat AP2/ERF transcription factors and functional characterization of TaERF-6-3A in response to drought and salinity stresses, *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3272.
122. Zhang GC, Zhu WL, Gai JY, Zhu YL, Yang LF (2015), Enhanced salt tolerance of transgenic vegetable soybeans resulting from overexpression of a novel $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from *Solanum torvum* Swartz, *Hortic Env Biotechnol*, 56, 94-4.
123. Zhang, X. X., Tang, Y. J., Ma, Q. B., Yang, C. Y., Mu, Y. H., Suo, H. C., ... & Nian, H. (2013), OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean, *PLoS One*, 8(12), e83011.
124. Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., & Ma, Y. (2009), Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco, *Journal of experimental botany*, 60(13), p.3781-3796.
125. Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J. K. (2022), Abiotic stress responses in plants, *Nature Reviews Genetics*, 23(2), 104-119.
126. Zhang, L., Tian, W., Huang, G., Liu, B., Wang, A., Zhu, J., & Guo, X. (2021), The SikCuZnSOD3 gene improves abiotic stress resistance in transgenic cotton, *Molecular Breeding*, 41(3), 26.

127. Zhao, S. P., Xu, Z. S., Zheng, W. J., Zhao, W., Wang, Y. X., Yu, T. F., ... & Zhang, X. H. (2017), Genome-wide analysis of the RAV family in soybean and functional identification of GmRAV-03 involvement in salt and drought stresses and exogenous ABA treatment, *Frontiers in plant science*, 8, 905.
128. Zhao, M. J., Yin, L. J., Liu, Y., Ma, J., Zheng, J. C., Lan, J. H., ... & Ma, Y. Z. (2019), The ABA-induced soybean ERF transcription factor gene GmERF75 plays a role in enhancing osmotic stress tolerance in Arabidopsis and soybean, *BMC Plant Biology*, 19, 1-14.
129. Zhou, Y., Chen, M., Guo, J., Wang, Y., Min, D., Jiang, Q., ... & Ma, Y. (2020), Overexpression of soybean DREB1 enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field, *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1842-1857.
130. Zhou, Y., Zhou, W., Liu, H., Liu, P., & Li, Z. (2020), Genome-wide analysis of the soybean DREB gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to drought stress, *Plant Breed*, 139(6), 1158-1167.
131. Zhou, L., Wang, C., Liu, R., Han, Q., Vandeleur, R. K., Du, J., ... & Shou, H. (2014), Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein GmPIP1; 6 confers salt tolerance, *BMC Plant Biology*, 14, 1-13.
132. Zhou, M. L., Ma, J. T., Pang, J. F., Zhang, Z. L., Tang, Y. X., & Wu, Y. M. (2010), Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors, *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9255-9269.
133. Zhou, X., Tian, Y., Qu, Z., Wang, J., Han, D., & Dong, S. (2023), Comparing the salt tolerance of different spring soybean varieties at the germination stage, *Plants*, 12(15), 2789.
134. Zhu, M., Zheng, L., Cao, S., Liu, Q., Wei, S., Zhou, Y., & Gao, F. (2024), AnDREB5. 1, a A5 group DREB gene from desert shrub *Ammopiptanthus nanus*, confers osmotic and cold stress tolerances in transgenic tobacco, *Physiologia Plantarum*, 176(2), e14272.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1 (PL1). Trình tự gene *GmDREB5* trên GenBank

Glycine max cv. Xanhtiendai partial mRNA for drought responsive element binding protein 5 (DREB5 gene)

GenBank: FR822737.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS FR822737 924 bp mRNA linear PLN 25-JUL-2016
DEFINITION Glycine max cv. Xanhtiendai partial mRNA for drought responsive element binding protein 5 (DREB5 gene).
ACCESSION FR822737
VERSION FR822737.1
KEYWORDS .
SOURCE Glycine max (soybean)
ORGANISM [Glycine max](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetales; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; 50 kb inversion clade; NPAAA clade; indigoferoid/millettioid clade; Phaseoleae; Glycine; Glycine subgen. Soja.
REFERENCE 1
AUTHORS Chu,M.H., Nguyen,T.V.T., Nguyen,H.H., Nguyen,N.T.B. and Chu,L.H.
TITLE Characterization of DREB5 gene isolated from Xanhtiendai soybean cultivar, Viet Nam
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 924)
AUTHORS Thanh,N.V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-FEB-2011) Thanh N.V., Genetics, ThaiNguyen University, Thainguyen City, 84, VIET NAM

[gene](#) <1..924
/gene="dreb5"
[CDS](#) <1..924
/gene="dreb5"
/codon_start=1
/product="drought responsive element binding protein 5"
/protein_id="CBZ41765.1"
/translation="MQFPHQFGTTTNSPFPHPSFQNNQHMISFGSSQQHNNLAYPPIIARDSSSLVHHHQQQQHQQLLQYWSGALNLSPRGMLTRLGPDGRPLFSPTQRINTTKLYRGVRQRHWGKWVAEIRLPRNTRLWLGTFTDAEDAMAYDREAFKQRGENARLNFPELFFNKDKKEQEEEEASSPVLSAIAKQNEPPPAHHRDVTIEESNENDSGDATVSD EVHAPAAATASSEGVSQLVWGEWSAFAIPAANGPGSPMWDLDATNNLLCQSHIPF SNPQQQFNDADDAQRQEQNTGPGYLWKDQD"

ORIGIN

```
1 atgcaattcc ctcaccaatt tgggaaccaca acaaaactcac ctttcctca cccatctttc
61 caaaaccagc aacaccagat gatatcatTT gggctctccc aacaacataa caatctcgca
121 tateccacaa tcatagcccg agattcttct tcaattgtac atcatcatca tcaacaacaa
181 caacagcatc agcagcaact tcttcagtat tggagtggcg cgttgaatct aagtccaaga
241 ggaatgttaa caagggtggg gccagatgga aggccattgt ttagtctccc aacacagcgc
301 ataaacacaa caaaactcta taggggagtg aggcaacgcc attggggcaa atgggtcgct
361 gaaatccgtc ttccacgaaa cagaacgcgt ctctggctag gcacatttga cacggccgaa
421 gacgcccca tggcctacga ccgcaagcc ttcaagcaac gaggagagaa tgcaaggctc
481 aatttcccg aattgttctt caacaaggac aaaaaagaac aaggagaaga agaagcttct
541 tcgccgggtc ttctggctat tgcaaaagcag aatgaacctc ctctgccc ccaaccgtgac
601 gtcacgatag aagagtctaa cgaatatgac tcaggtgagc ccaccgtgag cgacgaggtt
661 catgctcctg ctgtacagc gagttccgaa ggggtttctc aggaactggt ttggggagaa
721 atgtctgcat ggttcaatgc tattctgct gcttgggtc ctggtagtcc catgtgggat
781 gatttgatg ccaccaataa tcttctttgc caatcacaca ttctttttc caatccaat
841 caacaacagt tcaatgatgc tgatgatgct cagagacagg acaaaaacac aggaccaggt
901 tacctgtgga aggatcagga ttga
```

Phụ lục 2 (PL2) Trình tự amino acid của protein DREB5, miền AP2 (A) và những vị trí liên kết giữa amino acid với DNA (B)

FEATURES	Location/Qualifiers	
source	1..307 /organism="Glycine max" /cultivar="Xanhtiendai" /db_xref="taxon:3847" /tissue_type="leaf" /geo_loc_name="Viet Nam"	
Protein	<1..307 /product="drought responsive element binding protein 5"	
Region	107..169 /region_name="AP2" /note="DNA-binding domain in plant proteins such as APETALA2 and EREBPs; smart00380" /db_xref="CDD:197689"	
Site	order(108..109,111,113,115,117,121,123,130,132,135) /site_type="DNA binding" /note="DNA binding site [nucleotide binding]" /db_xref="CDD:237985"	A
CDS	1..307 /gene="dreb5" /coded_by="FR822737.1:<1..924"	
ORIGIN	1 mqfphqfgtt tnsfpfhpsf qnqqhqmisf gssqqhnnla yppiiardss slvhhhqqq 61 qqhqqqllqy wsgalnlspr gmltrlgpdg rplfspptqr inttklyrgv rqrhwgkwva 121 eirlprnrtr lwlgftdae daamaydrea fkqrqgenarl nfpelffnkd kkeqgeeeas 181 spvlsaiakq nepppahhrd vtieesnend sgdatvsdev hapaatasse gvsqelvwge 241 msawfnaipa awpggspmw dldatnllc qshipfsnqn qqfndadda qrqeqntgpg 301 ylwkdqd	
FEATURES	Location/Qualifiers	
source	1..307 /organism="Glycine max" /cultivar="Xanhtiendai" /db_xref="taxon:3847" /tissue_type="leaf" /geo_loc_name="Viet Nam"	
Protein	<1..307 /product="drought responsive element binding protein 5"	
Region	107..169 /region_name="AP2" /note="DNA-binding domain in plant proteins such as APETALA2 and EREBPs; smart00380" /db_xref="CDD:197689"	
Site	order(108..109,111,113,115,117,121,123,130,132,135) /site_type="DNA binding" /note="DNA binding site [nucleotide binding]" /db_xref="CDD:237985"	B
CDS	1..307 /gene="dreb5" /coded_by="FR822737.1:<1..924"	
ORIGIN	1 mqfphqfgtt tnsfpfhpsf qnqqhqmisf gssqqhnnla yppiiardss slvhhhqqq 61 qqhqqqllqy wsgalnlspr gmltrlgpdg rplfspptqr inttklyrgv rqrhwgkwva 121 eirlprnrtr lwlgftdae daamaydrea fkqrqgenarl nfpelffnkd kkeqgeeeas 181 spvlsaiakq nepppahhrd vtieesnend sgdatvsdev hapaatasse gvsqelvwge 241 msawfnaipa awpggspmw dldatnllc qshipfsnqn qqfndadda qrqeqntgpg 301 ylwkdqd	

Phụ lục 3 (PL3). Trình tự gene *GmDREB7* trên GenBank

Glycine max dehydration-responsive element binding protein 7 (LOC100101894), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001248108.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NM_001248108.2 Glycine max dehydration-responsive element binding protein 7
(LOC100101894), mRNA
AAACAACAACCAACGACGACGTTAGTTACTACTAACTACCCCTTTTGACACGTTGTCTCATTCACTCAA
ACAACCTCAAAGAAGCAAGCTTTTCACCAAGTAACATGTTTTCCATCAATCATTTCTCCGACCCAGATGC
CACCTCGCCGGGTCTGGGAGGAAGCTCCCGACCGGCGCTGTGCGACGAGGATTTTTCTGGCGGCAAGC
AATCCCAAGAAACGCGCGGGAGGAAGATTCCGGGAGACGCGCACCCGGTGTACCGCGCGTGAGAA
GGCGGGATCCGGCAAGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGAGCCCAACAAGAAGTCCAGGATTTGGCTCGGGAC
CTTTCCACGCGGAGATGGCGGCGCTGCGCATGACGTGGCGGCGATCGCGCTGAGGGGAAGGTCAGCC
TGCTCAACTTCGCGGACTCCGCGTCTCGGCTCCCGTGCCGCGGACGCGGAGGCCAGGGACATTGAGA
AGGCTGCGGCGGAGGCGCGAGAGCGTTTCGCCCTGGGAAGGATGATGATGCGGTGGCGGAGAGGTGGC
AGCGACGCGGAGCGGTGAAGAAGAACAAGAAGAAGGATGGTGCCGAGTATCTGAGGAACATGGTG
CTCATGTGCGCGACGCAATGCTTCGGGAGTGATGAGTATGGAAGTGTGACGTGGAATTTGACGATGCTG
AAGTTTCTCTGGGAGTTACTCATTATTTAACTCAGTTATTGGATTTTTTTTTTACTATTTTGAAGTA
ATGTAAGATTGTTCTGATGGGACAAGTAGAATAGTCCGTACTTATAATTTTTTACTAGTACGGTTGC
TCATTTTAGGTGCCAAAATAGATTAGAGCAGAAAGGAC
```

Phụ lục 4 (PL4). Trình tự amino acid của protein DREB7, miền AP2

```
Protein      1..207
              /product="dehydration-responsive element binding protein
              7"
              /calculated_mol_wt=22658
Region       54..112
              /region_name="AP2"
              /note="DNA-binding domain found in transcription
              regulators in plants such as APETALA2 and EREBP (ethylene
              responsive element binding protein). In EREBPs the domain
              specifically binds to the 11bp GCC box of the ethylene
              response element (ERE), a promoter...; cd00018"
              /db_xref="CDD:237985"
Site         order(55..56,58,60,62,64,68,70,77,79,82)
              /site_type="DNA binding"
              /note="DNA binding site [nucleotide binding]"
              /db_xref="CDD:237985"
CDS          1..207
              /gene="LOC100101894"
              /coded_by="NM_001248108.2:106..729"
              /db_xref="GeneID:100101894"
ORIGIN
      1 mfsinhfsdp datspgsggs srpalsdedf flaasnpkkr agrkkfretr hpvyrgrvrrr
      61 dsqkwvcevr epnkksriwl gtfptaemaa rahdvaaiial rgrsaclnfa dsasrlpvpa
     121 taeardiqka aaeaaefrp gkdddavaer vaatateree eqeegmvpey lrnmvlmspt
     181 hcfgsdeygs advefddaev slwsysi
```

Phụ lục 5 (PL5). Những vị trí liên kết giữa amino acid của protein DREB7 với DNA

```

Protein      1..207
              /product="dehydration-responsive element binding protein
              7"
              /calculated_mol_wt=22658
Region       54..112
              /region_name="AP2"
              /note="DNA-binding domain found in transcription
              regulators in plants such as APETALA2 and EREBP (ethylene
              responsive element binding protein). In EREBPs the domain
              specifically binds to the 11bp GCC box of the ethylene
              response element (ERE), a promotor...; cd00018"
              /db_xref="CDD:237985"
Site         order(55..56,58,60,62,64,68,70,77,79,82)
              /site_type="DNA binding"
              /note="DNA binding site [nucleotide binding]"
              /db_xref="CDD:237985"
CDS          1..207
              /gene="LOC100101894"
              /coded_by="NM_001248108.2:106..729"
              /db_xref="GeneID:100101894"
ORIGIN
1 mfsinhfsdp datspgsggs srpalsdedf flaa snpkkr agrkkfretr hpvyrgvrrr
61 dsgkwvcevr epnkksriwl gffptaemaa rahdvaaial ngrsaclnfa dsasrlpvp
121 taeardioka aaeaaefrp gkdddavaer vaatater ee qeegmvpey lrnmvlmspt
181 hc fgsdeygs advefd daev slwsysi

```

Phụ lục 6 (PL6). Đặc điểm của giống đậu tương DT26

1. Nguồn gốc

Giống đậu tương DT26 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ - Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm chọn lọc từ tổ hợp lai giữa DT2000 x DT12 từ năm 2002. Giống được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận, cho sản xuất thử tại vùng Đồng bằng sông Hồng, Trung du vụ xuân và vụ đông theo Quyết định số 111/QĐ-TT ngày 03 tháng 6 năm 2008.



2. Đặc tính nông học

Giống đậu tương DT26 có thời gian sinh trưởng trung bình 90 - 95 ngày. Chiều cao cây

45 - 60 cm, phân cành khá từ 2 - 3 cành/cây. Hoa màu trắng, hạt vàng, rốn nâu đậm, quả chín có màu nâu.

Khả năng chống chịu : Chống đổ khá, chịu dòi đục thân, nhiễm nhẹ bệnh gỉ sắt.

Giống đậu tương DT26 có tỷ lệ quả ba hạt cao, khối lượng 100 hạt 18 - 19 g. Năng suất

21-29 tạ/ha, tùy thuộc vào mùa vụ và điều kiện thâm canh.

Phụ lục 7 (PL7). Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá

Hỗn hợp	Thành phần cho 1 lít dung dịch
Stock I	KNO_3 1,9g + KH_2PO_4 0,17g + NH_4NO_3 1,65g + MgSO_4 0,37g
Stock II	CaCl_2 0,44g
Stock III	H_3BO_3 6,2mg + $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3mg + $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025mg + $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025mg + $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6mg + $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25mg + KI 0,83mg
Stock IV	FeSO_4 27,8mg + Na_2EDTA 37,3mg
Stock V	Myo-Inositol 100mg + thiamine HCl 0,1mg + pyridoxine HCl 0,5mg + nicotic acid 0,5mg + Glycine 2mg
MS	20ml stock I + 10ml/stock (II, III, IV, V) + glucose 35g + agarose 8g
$\frac{1}{2}\text{MS}$	10ml stock I + 5ml/stock (II, III, IV, V)
GM	MS + BAP 1mg + sucrose 30g + agar 9g
RM	MS + IBA 0,1mg + sucrose 30g + agar 9g

Phụ lục 8 (PL8). Môi trường tái sinh và chuyển gene ở đậu tương

Môi trường	Thành phần cho 1 lít dung dịch
Gieo hạt (GM)	Muối B5 3,052g + sucrose 20 g + gellan 2,5 g, pH = 5,8 có bổ sung vitaminB5 1000X 1ml.
Tạo dịch huyền phù (CCM lỏng)	Muối B5 0,316g + BAP 1,7 mg + MES 3,9 g + GA3 0,25ml + sucrose 30 g, pH=5,4 có bổ sung: acetosyringone 40mg + dithiothreitol 154 mg + L-cysteine 400 mg + sodium 158 mg thiosulfate + vitaminB5 1000X 1ml.
Đồng nuôi cấy (CCM đặc)	Muối B5 0,316g + BAP 1,7 mg + MES 3,9g + GA3 0,25mg + sucrose 30 g + agar 6 g, pH = 5,4 có bổ sung: Acetosyringone 0,04g + vitaminB5 1000X 1ml.
Diệt khuẩn và tạo đa chồi (SIM)	Muối B5 3,052 g + MES 0,59 g + sucrose 30 g + agar 8 g, pH = 5,8 có bổ sung: BAP 1,67 mg + cefotaxim 500 mg + vitaminB5 1000X 1ml + phosphinothricin (bistar) 2 mg.
Tái sinh và kéo dài chồi (SEM)	MS 4,3 g + MES 0,59 g + sucrose 30 g + nước dừa 200 ml + gellan 2,5 g, pH = 5,8 có bổ sung: cefotaxim 500mg + vitamin B5 1000X 1ml + GA ₃ 500 mg + IAA 100 mg + L-asparagine monohydrate 50 mg + phosphinothricin 2,0 mg/l.
Ra rễ (RM)	MS 4,3 g + sucrose 20 g + MES 0,59 g + gellan 2,5 g, pH = 5,8 có bổ sung: cefotaxim 250 mg + IBA 100mg + vitaminB5 1000X 1ml + L-asparagine monohydrate 50mg + phosphinothricin 2,0 mg/l.

Phụ lục 9 (PL9). Dữ liệu trình tự gene, protein thuộc họ AP2 của đậu tương và *A. thaliana* sử dụng trong phân tích

TT	Gene/ Gene ID	Vị trí gene trên NST	Mã số của gene trên Genbank	Mã số của protein trên GenBank
1	<i>AP2-like</i> /100794096	5	EU857402	ACJ61491
2	<i>AP2</i> /100794096	5	XM_006579822	XP_006579885
3	<i>AP2</i> /100794096	5	XM_003524595	XP_003524643
4	<i>AP2</i> /100792442	17	XM_003550003	XP_003550051
5	<i>AP2</i> /100792442	17	XM_006600875	XP_006600938
6	<i>AP2</i> /100786333	11	XM_041006615	XP_040862549
7	<i>AP2</i> /100786333	11	XM_014763839	XP_014619325
8	<i>AP2</i> /100786333	11	XM_041006614	XP_040862548
9	<i>AP2</i> /100786333	11	XM_041006613	XP_040862547
10	<i>AP2</i> /100801975	1	XM_003517264	XP_003517312
11	<i>AP2</i> /100801975	1	XM_006573579	XP_006573642
12	<i>AP2</i> /100801975	1	XM_041016561	XP_040872495
13	<i>AP2</i> /100801975	1	XM_006573580	XP_006573643
14	<i>Lf1AP2</i> /102665767	8	KY930886	ARW71732
15	<i>Lf1AP2</i> /102665767	8	NM_001357489	NP_001344418
16	<i>V945152 AP2</i> /02665767	8	KY930885	ARW71731
17	<i>AP2</i> ;2/100813069	4	NM_001252765	NP_001239694
18	<i>AP2-1</i> / 100794316	6	NM_001254427	NP_001241356
19	<i>AP2-2</i> / 100813069	4	FJ228454	ACJ37436
20	<i>AP2-1</i> / 100794316	6	FJ228453	ACJ37435
21	<i>AP2_TINNY</i> / 100305349	14	NM_001250879	NP_001237808
22	<i>AP2-5</i> /100819512	6	NM_001253007	NP_001239936
23	<i>AP2-6_</i> /100813615	4	NM_001252952	NP_001239881
24	<i>AP2-5_</i> /100819512	6	FJ228457	ACJ37439
25	<i>AP2-6_</i> /100813615	4	FJ228458	ACJ37440
26	<i>AP2-4_</i> /100813313	14	NM_001252694	NP_001239623
27	<i>AP2-4_</i> /100813313	14	FJ228456	ACJ37438

28	AP2-3_ /100788144	13	NM_001254270	NP_001241199
29	AP2-9_ /100815913	11	FJ228461	ACJ37443
30	AP2-9_ /100815913	11	NM_001317462	NP_001304391
31	AP2-9_ /100815913	11	KT031085	ALA09109
32	187-AP2/100785364	1	KT031069	ALA09093
33	AP2-8_ /100798277	2	FJ228460	ACJ37442
34	AP2-8_ /100798277	2	NM_001253076	NP_001240005
35	67-AP2/100800134	14	KT031267	ALA09291
36	AP2-7/100800134	14	FJ228459	ACJ37441
37	AP2-7like/100777102	13	KF220923	AGP03746
38	RAP2-7/ 100777102	13	KF220914	AGP03737
39	RAP2-7/ 100777102	13	XM_041008511	XP_040864445
40	RAP2-7/ 100777102	13	KF220919	AGP03742
41	RAP2-7/ 100777102	13	KF220920	AGP03743
42	RAP2-7/ 100777102	13	KF220917	AGP03740
43	RAP2-7/ 100777102	13	KF220916	AGP03739
44	RAP2-7/ 100777102	13	KF220915	AGP03738
45	RAP2-7/ 100777102	13	XM_006594938	XP_006595001
46	RAP2-7/ 100777102	13	XM_003541960	XP_003542008
47	RAP2-7/100796271	15	XM_006597244	XP_006597307
48	RAP2-7/100796271	15	XM_003546994	XP_003547042
49	RAP2-7like/ 100777102	13	KF220918	AGP03741
50	AP2-7like/ 100777102	13	KF220907	AGP03730
51	AP2-7like/ 100777102	13	KF220906	AGP30729
52	AP2-7like/ 100777102	13	KF220905	AGP03728
53	AP2-7like/ 100777102	13	KF220904	AGP03727
54	AP2-7like/ 100777102	13	KF220903	AGP03726
55	AP2-7like/ 100777102	13	KF220902	AGP03725
56	AP2-7like/ 100777102	13	KF220901	AGP03724
57	AP2-7like/ 100777102	13	KF220900	AGP03723
58	AP2-7like/ 100777102	13	KF220899	AGP03722
59	AP2-7like/ 100777102	13	KF220921	AGP03744

60	<i>AP2-7like/</i> 100777102	13	KF220922	AGP03745
61	<i>AP2-7like/</i> 100777102	13	KF220898	AGP03721
62	<i>AP2 like/</i> 100819565	16	NM_001280575	NP_001267504
63	<i>AP2-EREBP/</i> 100812313	2	NM_001317445	NP_001304374
64	<i>AP2-type/</i> 100800716	17	NM_001317652	NP_001304581
65	<i>AP2-EREBP/</i> 100500531	18	NM_001352772	NP_001339701
66	<i>150AP2_EREBP/</i> 100500531	18	KT031094	ALA09118
67	<i>RAP7-like/</i> 114376440	11	KF220924	AGP03747
68	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006751	XP_040862685
69	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006752	XP_040862686
70	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006753	XP_040862687
71	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006754	XP_040862688
72	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006757	XP_040862691
73	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006756	XP_040862690
74	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006748	XP_040862682
75	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006747	XP_040862681
76	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006750	XP_040862684
77	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006749	XP_040862683
78	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006755	XP_040862689
79	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006746	XP_040862680
80	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006745	XP_040862679
81	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006744	XP_040862678
82	<i>RAP2-7like/</i> 100812898	11	XM_041006749	XP_040862683
83	<i>RAP2-7/</i> 100788303	12	XM_006592181	XP_006592244
84	<i>RAP2-7/</i> 100788303	12	XM_003540705	XP_003540753
85	<i>RAP2-7/</i> 00788303	12	XM_006592182	XP_006592245
86	<i>RAP2-7/</i> 100788303	12	XM_006592179	XP_006592242
87	<i>RAP2-7/</i> 100788303	12	XM_006592180	XP_006592243
88	<i>RAP2-7/</i> 100788303	12	XM_041007428	XP_040863362
89	<i>SGR-AP2/</i> 100301892	2	NM_001249003	NP_001235932
90	<i>AP2 like/</i> 100814117	3	XM_001280574	XP_006576817
91	<i>AP2 like/</i> 100786651	19	XM_006604291	XP_006604354

92	<i>AP2 like/100786651</i>	19	XM_003554123	XP_003554171
93	<i>AP2 like/100795084</i>	2	XM_003519037	XP_003519085
94	<i>AP2-ERF/100801107</i>	2	XM_003518634	XP_003518682
95	<i>AP2-ERF/100776987</i>	1	NM_001371117	NP_001358046
96	<i>AP2-ERF/100789009</i>	20	XM_003556217	XP_003556265
97	<i>AP2-like_/100797584</i>	18	XM_003552414	XP_003552462
98	<i>RAP2-2/100810376</i>	19	XM_006604868	XP_006604931
99	<i>EREBP/AP2/100170723</i>	3	KT031075	ALA09099
100	<i>AP2-EREBP/100812313</i>	2	KT031072	ALA09096
101	CS6626 <i>AP2</i>	4	EU550000	ACB30786
102	CS6608 <i>AP2</i>	4	EU549999	ACB30785
103	CS6603 <i>AP2</i>	4	EU549998	ACB30784
104	CS6182 <i>AP2</i>	4	EU549997	ACB30783
105	CS1602 <i>AP2</i>	4	EU549996	ACB30782
106	CS931 <i>AP2</i>	4	EU549995	ACB30781
107	CS6885 <i>AP2</i>	4	EU549991	ACB30777
108	CS906 <i>AP2</i>	4	EU549994	ACB30780
109	CS6922 <i>AP2</i>	4	EU549993	ACB30779
110	CS6896 <i>AP2</i>	4	EU549992	ACB30778
111	CS6824 <i>AP2</i>	4	EU549990	ACB30776
112	CS6810 <i>AP2</i>	4	EU549989	ACB30775
113	CS902 <i>AP2</i>	4	EU549988	ACB30774
114	CS6799 <i>AP2</i>	4	EU549987	ACB30773
115	CS6797 <i>AP2</i>	4	EU549986	ACB30772
116	CS6796 <i>AP2</i>	4	EU549985	ACB30771
117	CS6781 <i>AP2</i>	4	EU549984	ACB30770
118	CS6751 <i>AP2</i>	4	EU549983	ACB30769
119	CS6732 <i>AP2</i>	4	EU549982	ACB30768
120	CS6714 <i>AP2</i>	4	EU549981	ACB30767
121	CS6689 <i>AP2</i>	4	EU549980	ACB30766
122	CS6688 <i>AP2</i>	4	EU549979	ACB30765
123	CS6674 <i>AP2</i>	4	EU549978	ACB30764

124	CS901 AP2	4	EU549977	ACB30763
125	ABI4/ 818614	2	AF040959	AAC39489
126	AP2 12/ 841829	1	NM_104269	NP_175794
127	AP2 1/ 841117	1	NM_103607	NP_564496
128	CRAP2	4	DQ415923	ABD72616
129	RAP2.3/ 820929	3	AY142562	AAN13131
130	RAP2.12/ 841829	1	NM_001036108	NP_001031185
131	RAP2.6/ 840915	1	NM_103468	NP_175008
132	RAP2.2/ 820643	3	NM_180252	NP_850583
133	RAP2.6L/ 831174	5	NM_121336	NP_196837
134	RAP2.10/ 829843	4	NM_119854	NP_195408
135	RAP2.9/ 826148	4	NM_179009	NP_849340
136	RAP2.11/ 832099	5	NM_121984	NP_197480
137	RAP2.1/ 841117	1	NM_001333265	NP_001322276
138	RAP2.4/ 844143	1	NM_106457	NP_177931
139	AP2/ERF 59/ 837125	1	NM_100497	NP_172106
140	AP2/B3-like/ 838649	1	NM_101911	NP_173484
141	AP2/B3-like/ 838233	1	NM_101525	NP_173109
142	AP2/B3/ 841535	1	NM_103991	NP_175524
143	AP2/B3/ 841490	1	NM_103950	NP_175483

Phụ lục 10 (PL10). Dữ liệu trình tự gene, protein thuộc phân họ DREB của đậu tương và *A. thaliana* sử dụng trong phân tích

STT	Gene/ Gene ID	Nguồn gene DREB	Vị trí gene trên NST	Mã số của gene trên Genbank	Mã số của protein trên GenBank
1	<i>DREB</i> /1547642	Đậu tương	14	AF514908	AAP47161
2	<i>DREB1like</i> /547622	Đậu tương	9	NM_001248578	NP_001235507
3	<i>DREB1like</i> / 547622	Đậu tương	9	HE647689	CCF23020_YS
4	<i>DREB1</i> /547622	Đậu tương	9	NM_001248850	NP_001235799
5	<i>DREB1</i> /547622	Đậu tương	9	HE647688	CCF23019_VNS
6	<i>DREB1</i> /547622	Đậu tương	9	HE647687	CCF23018_PB
7	<i>DREB1</i> /547622	Đậu tương	9	FR822736	CBZ41764_XBB
8	<i>DREB1</i> /547622	Đậu tương	9	FJ965342	ACR44232
9	<i>DREB1E</i> /100797582	Đậu tương	10	XM_003536435	XP_003536483
10	<i>AP2like</i> /100819565	Đậu tương	16	NM_001280575	XP_003537143
11	<i>AP2like</i> /100819565	Đậu tương	16	HM165475	AEC12483
12	<i>DREB1B</i> /100813230	Đậu tương	10	XM_003536997	XP_003537045
13	<i>DREB1D</i> /100778541	Đậu tương	13	XM_006594135	XP_006594198
14	<i>DREB1E</i> /100789097	Đậu tương	1	XM_003517407	XP_003517455
15	<i>DREB1E</i> /100779318	Đậu tương	17	XM_003550832	XP_003550880
16	<i>DREB1F</i> /100795696	Đậu tương	5	XM_003525492	XP_003525540
17	<i>DREB1F</i> /100810401	Đậu tương	12	XM_003540738	XP_003540786
18	<i>DREB1F</i> /100793751	Đậu tương	11	XM_003539131	XP_003539179
19	<i>DREB1F</i> /100803317	Đậu tương	13	XM_003541928	XP_003541976
20	<i>DREB1F</i> /100815039	Đậu tương	12	XM_003539412	XP_003539460
21	<i>DREB</i> /100499747	Đậu tương	13	BT089389	ACU13469
22	<i>DREB</i> /100499747	Đậu tương	13	NM_001248537	NP_001235466
23	<i>DREB</i> /100499747	Đậu tương	13	AY244760	AAP83131
24	<i>DREB</i> /100527471	Đậu tương	12	BT092314	ACU16563
25	<i>DREBa</i> /100788110	Đậu tương	12	NM_001358347	NP_001345276

26	<i>DREBa</i> /100788110	Đậu tương	12	AY542886	AAT12423
27	<i>DREB2</i> /100818839	Đậu tương	8	AY296651	AAQ57226
28	<i>DREB</i> /100818839	Đậu tương	8	NM_001358349	NP_001345278
29	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	LK936509; DT26	CDU32447
30	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	LK936508;DT51	CDU32446
31	<i>DREB2</i> /100801528	Đậu tương	4	LK936507;DT2008	CDU32445
32	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	HG965101	CDO19441
33	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	HG965100	CDO19440
34	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	HG965099; CBD	CDO19439
35	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	HG965097; CB	CDO19437
36	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	HG965098; DVN5	CDO19438
37	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	FJ965341	ACR44231
38	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	NM_001250325	NP_001237254
39	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	DQ208968	ABB36645
40	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	DQ054363	AAV89658
41	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	JF946767	AEQ61579
42	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	JF946771	AEQ61583
43	<i>DREB2</i> /732579	Đậu tương	6	JF946768	AEQ61580
44	<i>DREB2</i> /100801528	Đậu tương	4	JF946770	AEQ61582
45	<i>DREB2</i> /100801528	Đậu tương	4	JF946766	AEQ61578
46	<i>DREB2</i> /100801528	Đậu tương	4	JF946769	AEQ61581
47	<i>DREB2A2</i> /100800134	Đậu tương	14	NM_001254013	NP_001240942
48	<i>DREB2Clike</i> /10079827	Đậu tương	2	NM_001253076	NP_001240005
49	<i>DREB2D</i> /100790057	Đậu tương	4	XM_003523515	XP_003523563
50	<i>DREB2D</i> /100797850	Đậu tương	6	XM_003527831	XP_003527879
51	<i>DREB2F</i> /100808363	Đậu tương	2	XM_003518062	XP_003518110
52	<i>DREB2F</i> /100808719	Đậu tương	10	XM_003535116	XP_003525164
53	<i>DREB2F</i> /100801311	Đậu tương	19	XM_003553372	XP_003553420
54	<i>DREB2Clike</i> /10078379	Đậu tương	6	NM_001253309	NP_001240238
55	<i>DREB2Clike</i> /10078379	Đậu tương	6	NM_001400009	NP_001386938
56	<i>DREB3</i> /732559	Đậu tương	4	NM_001250024	NP_001236953
57	<i>DREB3</i> /732559	Đậu tương	4	DQ055133	AAZ03388

58	<i>DREB3/732656</i>	Đậu tương	17	NM_001251571	NP_001238500
59	<i>DREB3/732656</i>	Đậu tương	17	DQ208969	ABB36646
60	<i>DREB3like/100794316</i>	Đậu tương	6	NM_001254427	NP_001241356
61	<i>DREB3like/100786075</i>	Đậu tương	1	XM_003516413	XP_003516461
62	<i>DREB3/100804801</i>	Đậu tương	1	XM_003517021	XP_003517069
63	<i>DREB3/100804056</i>	Đậu tương	7	XM_003529711	XP_003529759
64	<i>DREB3/100817503</i>	Đậu tương	11	XM_003538700	XP_003538748
65	<i>DREB3/100783790</i>	Đậu tương	9	XM_003534380	XP_003534428
66	<i>DREB3/100784419</i>	Đậu tương	13	XM_003542042	XP_003542090
67	<i>DREB5/100101898</i>	Đậu tương	12	HE648568; BGi	CCF23313
68	<i>DREB5/100101898</i>	Đậu tương	12	HE648567; XBB	CCF23312
69	<i>DREB5/100101898</i>	Đậu tương	12	NM_001248171	NP_001235100
70	<i>DREB5/100101898</i>	Đậu tương	12	EF583447	ABQ53928
71	<i>DREB5/100809887</i>	Đậu tương	13	FR822737	CBZ41765
72	<i>DREB5/100809887</i>	Đậu tương	13	HE598783, PB	CCD42020
73	<i>DREB5/100809887</i>	Đậu tương	13	HE647690, NS	CCF23021
74	<i>DREB6/100101914</i>	Đậu tương	5	EF551166	ABQ42205
75	<i>DREB6/100101914</i>	Đậu tương	5	NM_001248412	NP_001235341
76	<i>DREB7/100101894</i>	Đậu tương	20	NM_001248108	NP_001235037
77	<i>DREB7/100101894</i>	Đậu tương	20	EF551167	ABQ42206
78	<i>DREB/100527471</i>	Đậu tương	12	NM_001249580	NP_001236509
79	<i>DREB1A/ 828652</i>	<i>A. thaliana</i>	4	NM_118680	NP_567720
80	<i>CBF1/ 828653</i>	<i>A. thaliana</i>	4	NM_118681	NP_567721
81	<i>CBF2/ 828651</i>	<i>A. thaliana</i>	4	NM_118679	NP_567719
82	<i>CBF4/ 835274</i>	<i>A. thaliana</i>	5	NM_124578	NP_200012
83	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336833	NP_001325153
84	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336830	NP_001325150
85	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336831	NP_001325151
86	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336832	NP_001325152
87	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336829	NP_001325154
88	<i>DREB2B/ 820273</i>	<i>A. thaliana</i>	3	NM_111939	NP_187713
89	<i>DREB2C/ 818627</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_129594	NP_565929

90	DREB-EAR/ 816866	<i>A. thaliana</i>	2	NM_127898	NP_179915
91	AT1G77200/ 844056	<i>A. thaliana</i>	1	NM_106369	NP_177844
92	AT1G75490/ 843885	<i>A. thaliana</i>	1	NM_106202	NP_177681
93	AT1G71520/ 843492	<i>A. thaliana</i>	1	NM_105820	NP_177307
94	AT1G71450/ 843486	<i>A. thaliana</i>	1	NM_105814	NP_177301
95	AT1G44830/ 841047	<i>A. thaliana</i>	1	NM_103564	NP_175104
96	AT1G33760/ 840267	<i>A. thaliana</i>	1	NM_103095	NP_174636
97	AT1G22190/ 838824	<i>A. thaliana</i>	1	NM_102069	NP_173638
98	DREB26/ 838793	<i>A. thaliana</i>	1	NM_102039	NP_173609
99	AT1G19210/ 838504	<i>A. thaliana</i>	1	NM_101779	NP_173355
100	AT1G12630/ 837819	<i>A. thaliana</i>	1	NM_101133	NP_172723
101	AT1G01250/ 839322	<i>A. thaliana</i>	1	NM_100008	NP_563624
102	AT4G31060/ 829233	<i>A. thaliana</i>	4	NM_119256	NP_567867
103	AT1G22810/ 838887	<i>A. thaliana</i>	1	NM_102128	NP_173695
104	AT5G65130/ 836637	<i>A. thaliana</i>	5	NM_001345671	NP_001329953
105	AT5G65130/ 836637	<i>A. thaliana</i>	5	NM_125912	NP_201318
106	AT1G64380/ 842745	<i>A. thaliana</i>	1	NM_105113	NP_176620
107	Ddf2/ 842606	<i>A. thaliana</i>	1	NM_001084295	NP_001077764
108	Ddf2/ 842606	<i>A. thaliana</i>	1	NM_104981	NP_176491
109	Ddf1/ 837817	<i>A. thaliana</i>	1	NM_101131	NP_172721
110	AT5G52020/ 835277	<i>A. thaliana</i>	5	NM_124581	NP_200015
111	AT5G21960/ 832256	<i>A. thaliana</i>	5	NM_147879	NP_680184
112	AT5G18450/ 831963	<i>A. thaliana</i>	5	NM_121850	NP_197346
113	DREB2A/ 830424	<i>A. thaliana</i>	5	NM_120623	NP_196160
114	AT4G39780/ 830136	<i>A. thaliana</i>	4	NM_120141	NP_195688
115	AT4G32800/ 829416	<i>A. thaliana</i>	4	NM_119433	NP_195006
116	AT4G28140/ 828929	<i>A. thaliana</i>	4	NM_118954	NP_194543
117	AT4G16750/ 827379	<i>A. thaliana</i>	4	NM_117777	NP_193408
118	AT4G13620/ 826996	<i>A. thaliana</i>	4	NM_117436	NP_193098
119	AT3G60490/ 825220	<i>A. thaliana</i>	3	NM_115913	NP_191608
120	AT3G57600/ 824929	<i>A. thaliana</i>	3	NM_115620	NP_191319
121	AT3G16280/ 820874	<i>A. thaliana</i>	3	NM_112499	NP_188249

122	<i>AT3G16280/ 820874</i>	<i>A. thaliana</i>	3	NM_001338227	NP_001327746
123	<i>AT2G40350/ 818628</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336834	NP_001324965
124	<i>AT2G44940/ 819103</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_130059	NP_182021
125	<i>AT2G40350/ 818628</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_129595	NP_181566
126	<i>DREB19/ 818414</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_001336696	NP_001318372
127	<i>AT2G22200/ 816754</i>	<i>A. thaliana</i>	2	NM_127788	NP_179810
128	<i>DREB2A/ 830424</i>	<i>A. thaliana</i>	5	NM_001036760	NP_001031837

GmDREB5



Phụ lục 12 (PL12). Danh sách các dòng thuốc lá chuyển gene TG0 được tạo ra từ cây TG0 trong ống nghiệm

STT	Cây chuyển gene TG0 trong ống nghiệm	Số lượng cây nhân bản trong ống nghiệm	Số lượng cây trồng trên giá thể trong nhà lưới	Ký hiệu các dòng chuyển gene ở thế hệ TG0
1	TG01	3	2	TG01
2	TG02	3	2	TG02
3	TG05	4	2	TG05
4	TG06	3	2	TG06
5	TG08	3	2	TG08
6	TG09	4	2	TG09
7	TG10	3	2	TG10
8	TG011	3	2	TG011
9	TG013	3	2	TG013
10	TG015	3	2	TG015
11	TG016	4	2	TG016
12	TG018	3	2	TG018
13	TG020	3	2	TG020
14	TG022	3	2	TG022
15	TG024	3	2	TG024
16	TG025	3	2	TG025
17	TG027	4	2	TG027
18	TG028	3	2	TG028
Tổng	18	58	2	18 dòng

Phụ lục 13 (PL13). Trình tự nucleotide của gene *GmDREB7* bao gồm vùng mã hóa, điểm cắt của enzyme *XbaI* và *BamHI* ở đầu 5', điểm cắt enzyme *SacI* đầu 3'T

XbaI *BamHI*
actagaggatccatgttttccatcaatcatttctccgacccagatgccacctcgccggggtcgggaggaagctcccg
accggcgctgtcggacgaggatttttttctggcggcaagcaatccaagaaacgcgcgggaggaagaagtccggg
agacgcgccaccgggtgtaccgcggcgtgagaaggcgggactccggcaagtgggtgtgcgaggtgcgcgagcccaac
aagaagtccaggatttggtcgggacctttccacggcggagatggcggcgctgcgcatgacgtggcggcgatcgc
gctgaggggaaggtcagcctgcctcaacttcgccgactccgcgtctcggctcccgggtgcgggcgacggcggaggcca
gggacattcagaaggctgcggcggaggccgcagaggcgtttcgccctgggaaggatgatgatgcggtggcggagagg
gtggcagcgacggcgacggagcgtgaagaagaacaagaagaagggatggtgccggagtatctgaggaacatggtgct
catgtcgccgacgcattgcttcgggagtgatgagtatggaagtgctgacgtggaatttgacgatgctgaagtttctc
tgtggagttactccattcccggggagcagaagctgattcagaggaggacctgaaggatgaactttaagagctc
XmaI *c-MYC* *KDEL* *SacI*