

CHUYỂN GEN *GLYCINE MAX CHALCONE ISOMERASE 1A* VÀO CÂY THUỐC LÁ THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*: MỘT MÔ HÌNH CHO TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN GEN *GmCHI1A* Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

Lê Thị Hồng Trang^{1,2}, Chu Hoàng Mậu¹, Nguyễn Hữu Quân^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên,

²Trường Cao đẳng Sư phạm Thái Nguyên

TÓM TẮT

Isoflavone là sản phẩm tự nhiên có trong mầm hạt đậu tương gồm hai dạng glycoside và aglucone, trong đó aglucone dễ hấp thu đối với người, nhưng hàm lượng lại rất thấp. Do đó, hàm lượng isoflavone dạng aglucone được nâng cao trong hạt đậu tương thông qua ứng dụng của công nghệ sinh học là cần thiết. Isoflavone được tổng hợp từ một nhánh của con đường phenylpropanoid với sự tham gia của nhiều enzyme trong đó chalcone isomerase (CHI) là enzyme chìa khóa. Các nghiên cứu đều cho rằng, sự biểu hiện mạnh gen mã hóa CHI đều làm tăng hàm lượng isoflavone ở cây chuyển gen. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả chuyển gen *Glycine max chalcone isomerase 1A* (*GmCHI1A*) có nguồn gốc từ cây đậu tương vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và tạo cây thuốc lá chuyển gen. Từ 90 mẫu biến nạp đã tạo được 30 cây thuốc lá chuyển gen sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới, hiệu suất chuyển gen là 33,33%. Kết quả phân tích PCR thu được 22 cây thuốc lá chuyển gen có gen chuyển *GmCHI1A* và hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích này là 24,44%. Gen chuyển *GmCHI1A* được xác nhận đã biểu hiện ở cây thuốc lá bằng phân tích RT-PCR. Kết quả chuyển gen *GmCHI1A* vào cây thuốc lá là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen.

Từ khóa: Chalcone isomerase, chuyển gen, gen *GmCHI1A*, isoflavone, thuốc lá

Ngày nhận bài: 20/9/2019; Ngày hoàn thiện: 11/10/2019; Ngày đăng: 17/10/2019

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION WITH *GLYCINE MAX CHALCONE ISOMERASE 1A* GENE IN TOBACCO: A MODEL FOR OVEREXPRESSION OF *GMCHI1A* GENE IN SOYBEAN PLANTS

Le Thi Hong Trang^{1,2}, Chu Hoang Mau¹, Nguyen Huu Quan^{1*}

¹University of Education – TNU, ²Thai Nguyen College of Education

ABSTRACT

Isoflavones are natural products in soybean seed germs, including glycosides and aglucones, of which aglucone is easily absorbed for human, but very low in content. Therefore, the content of aglucone enhanced in soybean seeds through the application of biotechnology are necessary. Isoflavones are produced via a branch of the general phenylpropanoid pathway and are involved in many enzymes, of which chalcone isomerase is the key enzyme. The studies showed that the overexpression of the CHI gene increases the isoflavone content in transgenic plants. In this study, we present the results of *Agrobacterium*-mediated transformation with *GmCHI1A* gene from soybean plants into tobacco and created transgenic plants. From 90 transformed samples, thirty transgenic tobacco plants were created and they grew normally under greenhouse conditions, transgenic efficiency was 33.33%. Twenty-two transgenic tobacco plants were identified to contain the *GmCHI1A* transgenic gene by PCR and the transgenic efficiency was 24.44%. The *GmCHI1A* transgene was confirmed to be expressed in tobacco by RT-PCR analysis. These results are the basis for further research on overexpression of *GmCHI1A* gene in transgenic soybean plants.

Keywords: Chalcone isomerase, gene transfer, *GmCHI1A* gene, isoflavone, tobacco

Received: 20/9/2019; Revised: 11/10/2019; Published: 17/10/2019

* Corresponding author. Email: quannh@dhsptn.edu.vn

1. Mở đầu

Isoflavone là sản phẩm tự nhiên quan trọng có vai trò bảo vệ thực vật và sức khỏe con người. Isoflavone có nhiều trong mầm hạt đậu tương, nhưng hàm lượng tương đối thấp, khoảng từ 50-3000 $\mu\text{g/g}$. Isoflavone trong hạt đậu tương tồn tại ở hai dạng chính là β -glucoside và aglucone [1]. Dạng β -glycoside có trọng lượng phân tử lớn được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa của người; trong khi dạng aglucone được hấp thụ nhanh hơn, nhưng hàm lượng lại rất thấp [2]. Để khắc phục vấn đề trên, việc lựa chọn các ứng dụng công nghệ sinh học góp phần nâng cao hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương, đặc biệt là dạng aglucone dễ hấp thụ cho hệ tiêu hóa của người đang rất được quan tâm nghiên cứu.

Isoflavone được tổng hợp từ một nhánh của con đường phenylpropanoid. Quá trình chuyển hóa tổng hợp isoflavone có nhiều enzyme tham gia, bao gồm phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), chalcone reductase (CHR), chalcone isomerase (CHI), isoflavone synthase (IFS) và các enzyme khác. CHI là enzyme chìa khóa xúc tác cho phản ứng từ phân tử naringenin chalcone mạch hở được đóng vòng để hình thành các naringenin. CHI được phân thành hai loại chính là CHI loại I và CHI loại II. Các CHI loại I được tìm thấy trong hầu hết các loại thực vật, bao gồm cả cây họ đậu và không phải cây họ đậu; còn các CHI loại II chỉ có ở cây họ đậu [3]. Các CHI loại I xúc tác chuyển đổi naringenin-chalcone (2',4',6',4'-tetrahydroxychalcone) thành 5-hydroxy-flavonoid. Các CHI sử dụng cả naringenin-chalcone và isoliquiritigenin (2',4',4'-trihydroxychalcone) để tổng hợp naringenin và liquiritigenin. Naringenin và liquiritigenin là hai tiền chất của phản ứng tạo

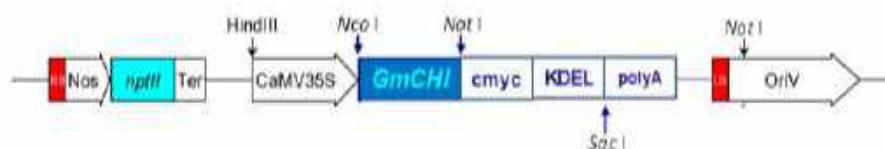
thành isoflavone (glycitein, daidzein, genistein) với sự tham gia của IFS [4]. Nghiên cứu biểu hiện gen *CHI* đã được thực hiện ở một số đối tượng như Hành tây [5], Dạ yến thảo [6], Cà chua [7]. Những nghiên cứu này đều cho rằng, sự tăng cường biểu hiện gen *CHI* đều làm tăng hàm lượng isoflavone tổng số ở cây chuyển gen lên nhiều lần so với cây không chuyển gen. Gen *GmCHI1A* phân lập từ cây đậu tương mã hóa enzyme *CHI1A* thuộc CHI loại II. Gen *GmCHI1A* có 657 bp, mã hóa 218 amino acid [8]. Vì vậy, cách tiếp cận tăng cường biểu hiện gen mã hóa enzyme chìa khóa *CHI1A* được chúng tôi lựa chọn để nâng cao hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương.

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) đã trở thành một hệ thống mô hình cho nuôi cấy mô và kỹ thuật di truyền trong nhiều thập kỷ qua và được sử dụng để nghiên cứu chức năng gen mới. Hệ thống tái sinh *in vitro* ở cây thuốc lá tương đối đơn giản và thời gian phân hóa từ mô đến cây hoàn chỉnh khá ngắn nên thuốc lá được sử dụng nhằm tối ưu hóa kỹ thuật chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* [9]. Do đó, trong nghiên cứu này thuốc lá được chọn làm cây mô hình để đánh giá hoạt động của cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* trước khi chuyển vào đậu tương.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống thuốc lá K326 *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. Chúng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* do Bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục sinh học cung cấp. Cấu trúc vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A* được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc 35S_ *GmCHI1A*_ *cmyc* trong vector chuyển gen *pCB301_GmCHI1A*. *nptII*: Gen kháng kanamycin; *CaMV35S*: Promoter 35S; *GmCHI*: Gen Glycine max chalcone isomerase 1A phân lập từ cây đậu tương; *cmyc*: Trình tự nucleotide mã hóa peptid c-myc; *KDEL*: Trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL

2.2. Phương pháp chuyển gen *GmCHI1A* vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* thông qua lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* vào mảnh lá và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được thực hiện như mô tả của Topping (1998) [10]. Lá cây thuốc lá được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 1×1 cm, sau đó các mảnh lá được ngâm trong dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp trong 10 phút. Chuyển các mảnh lá nhiễm khuẩn sang môi trường MS bổ sung BAP và kháng sinh chọn lọc kanamycin để tái sinh đa chồi. Các chồi chuyển vào môi trường RM bổ sung kanamycin để tạo rễ. Các cây chuyển gen *in vitro* được đưa ra trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới.

2.3. Phương pháp phân tích cây thuốc lá chuyển gen

Tách chiết DNA tổng số từ lá của cây thuốc lá thực hiện theo Saghai-Marooof và cộng sự (1992) [11]. Điện di kiểm tra DNA tổng số được tiến hành trên gel agarose 0,8%. Tách chiết RNA tổng số từ lá của cây thuốc lá chuyển gen bằng bộ kit Trizol Reagents. Tổng hợp cDNA bằng bộ kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis.

Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* trong hệ gen của các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 được phân tích bằng PCR. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI1A* ở mức phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR. Cặp mồi đặc hiệu *CHI-NcoI-F* (5'-ATGCCATGGATGGCAACGATCACCGC GGTT-3') và *CHI-NotI-R* (5'-TTGC GGCCGCGACTATAAT GCCGTGGCTC-3') sử dụng cho phản ứng PCR và RT-PCR nhân bản gen *GmCHI1A* được thiết kế dựa trên trình tự gen *CHI* của đậu tương mang mã số NM_00124829 trên GenBank.

Gen chuyển *GmCHI1A* được khuếch đại từ cây thuốc lá chuyển gen dự kiến có kích thước 677 nucleotide, bao gồm đoạn mã hóa

(657 nucleotide), đoạn nucleotide chứa điểm cắt của enzyme *NcoI* (9 nucleotide) và enzyme *NotI* (11 nucleotide).

Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích 25 µl) gồm: 12,5 µl master mix (2X); 1,0 µl mỗi mồi mỗi loại (10 pmol/µl); 2,0 µl DNA khuôn hoặc cDNA khuôn (10 ng/µl); 8,5 µl nước khử ion. Phản ứng PCR nhân gen *GmCHI1A* được thực hiện theo chương trình: 94°C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kì, mỗi chu kỳ gồm 94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; 72°C trong 10 phút và lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm 1X TAE. Gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide với nồng độ 0,1 µg/ml.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* vào cây thuốc lá

Tiến hành biến nạp cấu trúc mang gen chuyển *GmCHI1A* thông qua lây nhiễm bởi vi khuẩn *A. tumefaciens* vào mô lá cây thuốc lá (Hình 2). Kết quả bảng 1 cho thấy, sau ba lần biến nạp với 90 mẫu ở lô thí nghiệm thu được 83 mẫu tạo cụm chồi và qua chọn lọc bằng kháng sinh có 206 chồi sống sót. Ở môi trường tạo rễ có 163 chồi ra rễ và chọn lọc được 98 cây để chuyển ra trồng trong bầu đất. Kết quả cuối cùng tạo được 30 cây sống sót trong điều kiện nhà lưới. Lô đối chứng là các mảnh lá thuốc lá không biến nạp tái sinh trong môi trường không có kháng sinh chọn lọc (ĐC0) và có kháng sinh (ĐC1). Lô ĐC0 chuyển 10 cây ra trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới. Ở lô ĐC1, các mảnh lá không tái sinh chồi trong môi trường chứa kanamycin. Các cây thuốc lá chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được sử dụng để phân tích sự có mặt và sự hoạt động của vector mang gen chuyển *GmCHI1A*.

3.2. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen

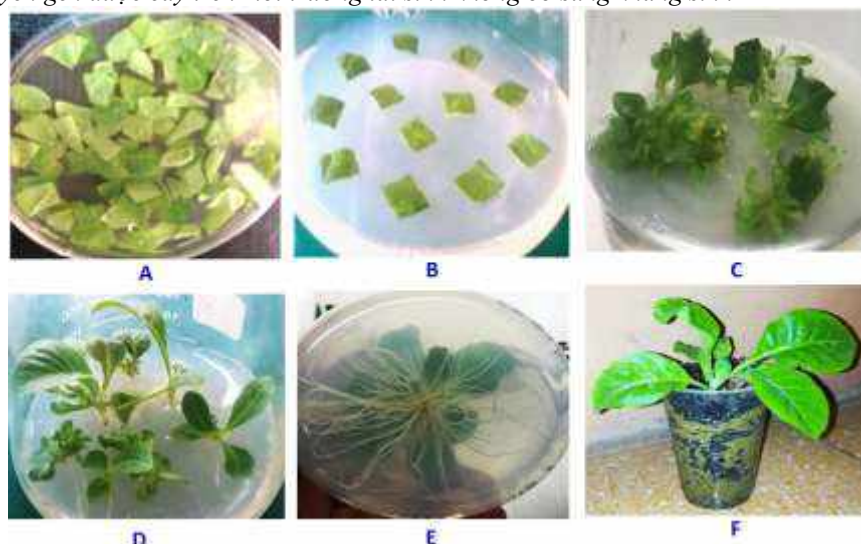
Ba mươi cây thuốc lá chuyển gen được phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmCHI1A* bằng PCR. Kết quả hình 3 nhận thấy ở các

cây số 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29 xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 0,67 kb ứng với kích thước của gen GmCHI1A. Trong khi, các cây số 1, 2, 3, 10, 14, 15, 26, 30 không xuất hiện băng DNA. Kết quả chọn được 22 cây dương tính với phản ứng PCR và hiệu suất chuyển gen GmCHI1A vào thuốc lá ở giai đoạn phân tích PCR là 24,44%.

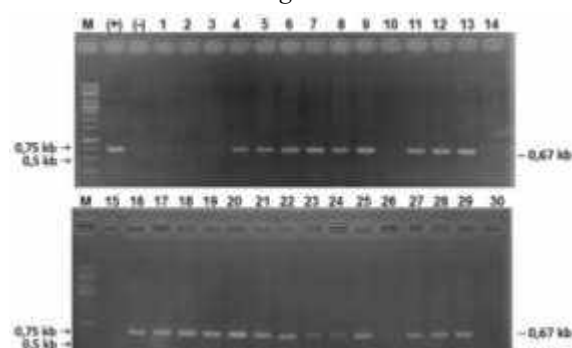
Bảng 1. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển GmCHI1A vào thuốc lá

Thí nghiệm và đối chứng		Số mẫu	Số mẫu sống tạo cụm chồi	Tổng số chồi	Số chồi sống sót ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây sống sót
Thí nghiệm	Lần biến nạp 1	30	29	68	48	36	12
	Lần biến nạp 2	30	28	71	54	32	8
	Lần biến nạp 3	30	26	67	41	30	10
	Tổng	90	83	206	163	98	30
Đối chứng 0 (ĐC0)		30	30	97	65	42	10
Đối chứng 1 (ĐC1)		30	0	0	0	0	0

Ghi chú: ĐC1: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC01: Mẫu không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

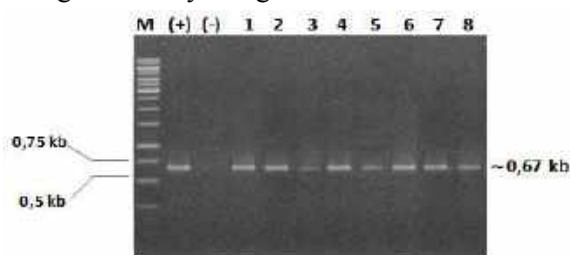


Hình 2. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen GmCHI1A. A: các mảnh lá thuốc lá trong dịch khuẩn và lây nhiễm; B: Đồng nuôi cấy trên môi trường CCM; C: Tái sinh đa chồi trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin; D: Kéo dài chồi; E: Ra rễ trên môi trường RM; F: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trên giá thể.



Hình 3. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gen chuyển GmCHI1A từ các cây thuốc lá chuyển gen ở thể hệ T0. M: thang DNA 1kb; (+): Plasmid pBT_GmCHI1A (đối chứng dương); (-) Cây không chuyển gen (WT - đối chứng âm); 1-30: Các cây thuốc lá chuyển gen ở thể hệ T0

Trong số 22 cây dương tính với PCR ở thế hệ T₀, chọn 8 cây thuốc lá chuyển gen sinh trưởng, phát triển bình thường đem phân tích biểu hiện gen *GmCHI1A* ở mức phiên mã bằng RT-PCR. Lá non của 8 cây thuốc lá chuyển gen được tách chiết RNA tổng số và tạo cDNA, sau đó thực hiện PCR với cặp mồi CHI-NcoI-F/CHI-NotI-R. Kết quả nhân bản gen chuyển *GmCHI1A* (cDNA) từ mRNA của các cây thuốc lá chuyển gen đem phân tích cho thấy trên bản gel agarose tất cả 8 làn điện di đều có băng DNA với kích thước khoảng 0,67 kb (Hình 4). Kết quả này đã xác nhận gen chuyển *GmCHI1A* được biểu hiện phiên mã tổng hợp mRNA. Như vậy, có thể nhận thấy vector chuyển gen pCB301_ *GmCHI1A* hoạt động tốt trong cây thuốc lá chuyển gen và có thể sử dụng để chuyển vào cây đậu tương và các cây trồng khác.



Hình 4. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR nhân gen *GmCHI1A* (cDNA) từ mRNA của 8 cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T₀. M: thang DNA 1kb; (+): Plasmid pBT_ *GmCHI1A* (đối chứng dương); (-) Cây không chuyển gen (WT - đối chứng âm); 1-8: Các cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T₀

Cây *Arabidopsis thaliana* là hệ thống mô hình thực vật chính trong nhiều thập kỷ qua đã đạt được những tiến bộ to lớn trong nghiên cứu chức năng gen và tạo cây chuyển gen ở thực vật. Đến nay, nhiều mô hình thực vật mới đang được đề xuất, trong đó cây thuốc lá với những ưu thế dễ nuôi cấy *in vitro*, tái sinh và hệ số tái sinh đa chồi, hệ số tiếp nhận gen cao được coi là ý tưởng tốt để sử dụng làm cây mô hình [12]. Theo Tepfer (2017) cùng với cây *A. thaliana*, cây thuốc lá có thể đưa lên Trạm vũ trụ quốc tế để mô phỏng sự chuyển giao sự sống lên hành tinh khác [13].

Cây thuốc lá được sử dụng làm cây mô hình cho chuyển gen và tăng cường biểu hiện ở đậu tương đã được công bố trong những năm gần đây, như chuyển gen *GmP5CS* [14], gen *GmEXP1* [15], cấu trúc RNAi [16], gen *HA1* [17] và gen *GmDREB2* [18]. Theo cách tiếp cận này, nghiên cứu của chúng tôi cũng sử dụng thuốc lá làm cây mô hình để chuyển gen *GmCHI1A* trước khi phân tích biểu hiện mạnh ở đậu tương trong mục đích tăng hàm lượng isoflavone. Hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích PCR đối với gen *GmEXP1* là 53,33% [15], gen *GmDREB2* là 48,33% [18] và trong nghiên cứu của chúng tôi đối với gen *GmCHI1A* là 24,44%. Như vậy, hiệu suất biến nạp các gen có nguồn gốc từ đậu tương vào thuốc lá là rất cao và phụ thuộc vào từng loại gen. Trong nghiên cứu biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây Sâm đất (*Talinum paniculatum*), với 730 mẫu biến nạp chúng tôi thu được 8 cây Sâm đất ở thế hệ T₀ dương tính với PCR, hiệu suất chuyển gen *GmCHI* ở giai đoạn này được xác định đạt 1,09% [19]. Như vậy, kết quả biểu hiện thành công gen *GmCHI1A* ở cây thuốc lá và cây Sâm đất là cơ sở để tiếp tục thực hiện biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen.

4. Kết luận

Đã biến nạp thành công gen chuyển *GmCHI1A* có nguồn gốc từ đậu tương vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Từ 90 mẫu biến nạp đã tạo được 30 cây thuốc lá chuyển gen sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới, hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn chọn lọc bằng kháng sinh trong điều kiện *in vitro* là 33,33%. Hai mươi hai cây thuốc lá chuyển gen được xác định có gen chuyển *GmCHI1A* và hiệu suất chuyển gen ở giai đoạn phân tích PCR là 24,44%. Sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI1A* được xác nhận ở mức phiên mã bằng RT-PCR. Kết quả biểu hiện thành công gen *GmCHI1A* ở cây thuốc lá là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *GmCHI1A* trên cây đậu tương chuyển gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Tsukamoto, M.A. Nawaz, A. Kurosaka, B. Le, J. D. Lee, E. Son, S. H. Yang, C. Kurt, S. Baloch, G. Chung, "Isoflavone profile diversity in Korean wild soybeans (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.)", *Turk. J. Agric. F.* 42, pp. 248-261, 2018.
- [2]. T. Izumi, M. K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, M. Kikuchi, "Soy isoflavone aglucones are absorbed faster and in higher amounts than their glycosides in humans", *J. Nutr.*, 130, pp. 1695-1699, 2000.
- [3]. L. N. Prasad and N. P. Shah, "Conversion of isoflavone glycoside to aglycones in soy protein isolate (SPI) using crude enzyme extracted from *Bifidobacterium animalis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842", *International Food Research Journal*, 19 (2), pp. 433-439, 2011.
- [4]. Y. Oliver and M. G. Brian, "Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis", *Advances in Agronomy*, 86, pp. 147-190, 2005.
- [5]. S. Kim, R. Jones, K. Yoo, L. Pike, "Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon", *Mol. Genet Genomics*, 272, pp. 411-419, 2004.
- [6]. K. A. Fatemeh, B. Abdolreza, M. Nasrin, "Analysis of *chalcone synthase* and *chalcone isomerase* gene expression in pigment production pathway at different flower colors of *Petunia Hybrida*", *J. Cell. Mol. Res.*, 8(1), pp. 8-14, 2016.
- [7]. W. Lim and J. Li, "Co-expression of onion chalcone isomerase in *Del/Ros1*-expressing tomato enhances anthocyanin and flavonol production", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 128 (1), pp. 113-124, 2016.
- [8]. T. H. T. Le, T. M. Ho, H. P. Hoang, S. V. Le, M. H. Chu, "Glycine max mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase (CHI) gene), cultivar DT26", 2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT594994.1>
- [9]. R. G. Thumballi, P. Suprasanna, P. S. Rao, A. B. Vishwas, "Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering", *Indian Journal of Biotechnology*, 3(2), pp.171-184, 2004.
- [10]. J. E. Topping, "Tobacco transformation", *Methods Mol. Biol.*, 81, pp. 365-372, 1998.
- [11]. M. A. Saghai-Marooof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R.W. Allard, "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics", *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, pp. 8014-8018, doi: 10.1073/pnas.81.24.8014, 1984.
- [12]. C. Chang, L. John, Bowman, M. Elliot, Meyerowitz, "Field Guide to Plant Model Systems", *Cell*, 167(2), pp. 325-339, 2016.
- [13]. D. Tepfer, "DNA Transfer to Plants by *Agrobacterium rhizogenes*: A Model for Genetic Communication Between Species and Biospheres", *Transgenesis and Secondary Metabolism*, pp. 3-43, 2017.
- [14]. Nguyễn Thị Thúy Hương, *Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam*, Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên, 2011.
- [15]. Thanh Son LO, Hoang Duc LE, Vu Thanh Thanh NGUYEN, Hoang Ha CHU, Van Son LE, Hoang Mau CHU, "Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco", *Turk. J. Bot.*, 39, pp. 988-995, 2015.
- [16]. Lo Thi Mai Thu, Vi Thi Xuan Thuy, Le Hoang Duc, Le Van Son, Chu Hoang Ha and Chu Hoang Mau, "RNAi-mediated resistance to SMV and BYMV in transgenic tobacco", *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, pp. 213-218, 2016.
- [17]. Nguyễn Thu Hiền, *Nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein bề mặt của virus H5N1 vào cây đậu tương phục vụ sản xuất vaccine thực vật*, Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên, 2014.
- [18]. Dao Xuan Tan, Ho Manh Tuong, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son and Chu Hoang Mau, "Cloning and Overexpression of GmDREB2 Gene from a Vietnamese Drought-resistant Soybean Variety", *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 58(5), pp. 651-657, 2015.
- [19]. T.N.T. Vu, T.H.T. Le, P.H. Hoang, D.T. Sy, T.H.T. Vu, H.M. Chu, "Overexpression of the *Glycine max chalcone isomerase (GmCHI)* gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants", *Turk. J. Bot.*, 42, pp. 551-558, doi:10.3906/bot-1801-22, 2018.