NGHIÊN CỨU BIẾN NẠP VÀ XÁC ĐỊNH SỰ CÓ MẶT CỦA GEN MÃ HÓA YẾU TỐ PHIÊN MÃ *ZmbZIP72* Ở CÂY NGÔ THẾ HỆ T0

Hà Hồng Hạnh[1], Hoàng Thị Thu Yến[2], Huỳnh Thị Thu Huệ[1*]
[1]Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[2]Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Các nghiên cứu đã cho thấy gen *ZmbZIP72* có tầm quan trọng đáng kể tới sự chống chịu hạn của thực vật cũng như với cây ngô. Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmbZIP72* dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng stress RD29A được chuyển vào cây ngô. Thí nghiệm chuyển gen được tiến hành trong 2 vụ là thu đông 2016 và 2017. Khi các cây ngô chuyển gen phát triển hoàn chỉnh trong phòng thí nghiệm thì được trồng ra nhà lưới để cây sinh trưởng phát triển và tiến hành tự thụ phấn cho cây. Phương pháp PCR với cặp mồi nhân gen chỉ thị *Hygromycin* và nhân gen *ZmbZIP72* được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trên các cây ngô. Vụ thu đông 2016, nhóm tác giả thu được 44 cây chuyển gen sống sót trong nhà lưới và có 2 cây dương tính với cặp mồi nhân gen *Hyg*. Với vụ thu đông 2017, có 140 cây chuyển gen sống sót và 17 cây dương tính với cặp mồi nhân gen *ZmbZIP72* và gen *Hyg*. Như vậy, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã thu được các cây chuyển gen T0 và sẽ đánh giá các thế hệ tiếp theo trong những vụ gieo hạt sau.

Từ khóa: *A. tumefaciens*; *chuyển gen; ngô*; *ZmbZIP72; chịu hạn*

Ngày nhận bài: 07/01/2020; Ngày hoàn thiện: 28/02/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

MAIZE TRANSFORMATIONAND DETERMINATION OF *ZmbZIP72*TRANSCRIPTION FACTOR GENE IN T0 PLANTS

Ha Hong Hanh[1], Hoang Thi Thu Yen[2], Huynh Thi Thu Hue[1*]
[1]Institute of Genome Research – VAST, [2]TNU - University of Sciences

ABSTRACT

Studies have shown that the *ZmbZIP72* gene is of significant importance to the drought tolerance of plants as well as to maize. In this study, the expression vector of plants carrying *ZmbZIP72* gene under the control of RD29A stress-induced promoter was transferred into maize. Transgenic experiments were conducted in autumn-winter crops 2016 and 2017. The transgenic maize plants were fully developed in the tissue culture laboratory then grown up in the greenhouse for self - pollination. Then, PCR to amplify *ZmbZIP72* and Hyg genes was used to test the presence of transgenes in maize plants. The results shown that, in autumn-winter of 2016, 44 transgenic plants survived in the greenhouse therein 2/44 were positive with Hyggene. In the autumn-winter crop of 2017, there were 140 transgenic plants surviving with 17 positive plants which were verified with *ZmbZIP72* primers and Hyg primers. In conclusion, the authors have obtained T0 transgenic plants, the next generations will be genotype evaluated in following season crop.

Keywords: *Agrobacterium; maize; transformation; ZmbZIP72gene; drought tolerance*

Received: 07/01/2020; Revised: 28/02/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. *Email: hthue@igr.ac.vn*

1. Mở đầu

Ngô (*Zea mays* L.) là cây trồng chính và là cây lương thực có vai trò kinh tế quan trọng nhất trên thế giới, sản lượng ngô từ 255 triệu tấn năm 1968 tăng lên 1,134 triệu tấn năm 2017. Theo dự đoán của FAO, nhu cầu về ngô sẽ tăng lên 50% với hơn 800 triệu tấn một năm và có thể vượt qua cả gạo và lúa mì vào năm 2020. Tuy nhiên, do tác động của biến đổi khí hậu, hạn hán xảy ra ngày càng thường xuyên, với mức độ ngày càng trầm trọng đe dọa mạnh mẽ tới nền sản xuất ngô trên thế giới. Trong bối cảnh đó, công nghệ sinh học được mong đợi sẽ đóng vai trò làm tăng sản lượng ngô đáp ứng đủ nhu cầu ngày một gia tăng của thế giới.

Nhân tố phiên mã là các protein có vai trò kiểm soát quá trình phiên mã bằng cách bám vào các vùng trình tự đặc hiệu trên promoter của gen. Các nhân tố phiên mã hiện nay được các nhà khoa học tập trung vào nghiên cứu và khai thác do tiềm năng sử dụng lớn trong công nghệ sinh học [1]. Các protein này có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của nhiều gen khác và ảnh hưởng lên nhiều khía cạnh của quá trình trao đổi chất ở cây. Nhiều nhân tố phiên mã liên quan đến khả năng chịu hạn đã được phát hiện và nghiên cứu trong nhiều năm qua [2]. Các nhân tố phiên mã này thay đổi mức độ biểu hiện của các gen liên quan phía sau trong con đường đáp ứng với hạn hán, do đó thay đổi các quá trình sinh hóa và phát triển làm tăng khả năng sống sót của cây. Nhiều nhân tố phiên mã đã được xác định là nhân tố phiên mã đáp ứng với hạn gồm WRKY, Zinc finger, AP2/ERF2, MYB, ZmDREB2A [3] và NAC [2].

Một số gen liên quan đến stress ở ngô đã được phân lập và mô tả khá rõ trong các nghiên cứu như Wei và cộng sự (2012) [4] đã xác định được 170 protein là yếu tố phiên mã bZIP ở ngô được mã hóa bởi 125 gen *bZIP* được đặt tên từ *ZmbZIP1* đến 125 dựa theo quy ước đặt tên của Jakoby và cộng sự (2002) [5] và được phân thành 11 nhóm như ở *Arabidopsis*. Đến nay, họ gen *bZIP* đã được nghiên cứu xác định tính đa dạng và phân tích sự biểu hiện trong toàn hệ gen trên nhiều loài khác như thầu dầu [6], các cây họ đậu [7]. Gen *ZmbZIP72* của cây ngô đã được phân lập và mô tả bởi Yingvà cộng sự (2012) [8]. Gen mã hóa *ZmbZIP72* chỉ có một bản sao trong hệ gen của ngô với kích thước 2164 bp, gồm 3 intron, giống với sự phân bố của các intron ở hầu hết các gen *bZIP* thuộc nhóm A ở *Arabidopsis* và lúa. Gen *ZmbZIP72* chứa một khung đọc mở dài 894 bp mã hóa cho chuỗi polypeptide dài 297 amino acid. Protein suy diễn của *ZmbZIP72* có trình tự amino acid tương đồng cao với protein OsbZIP72 của lúa. Khi chuyển cDNA *ZmbZIP72* vào *Arabidopsis* dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S, dòng chuyển gen thể hiện một số đặc điểm thích ứng với hạn. Những kết quả kiểu hình và thay đổi sinh lý này cho thấy sự biểu hiện mạnh của *ZmbZIP72* ở cây *Arabidopsis* chuyển gen có thể làm tăng đáng kể khả năng thích ứng với khô hạn. Qua đó cho thấy, gen *ZmbZIP72* có tầm quan trọng đáng kể tới sự chống chịu hạn của thực vật.

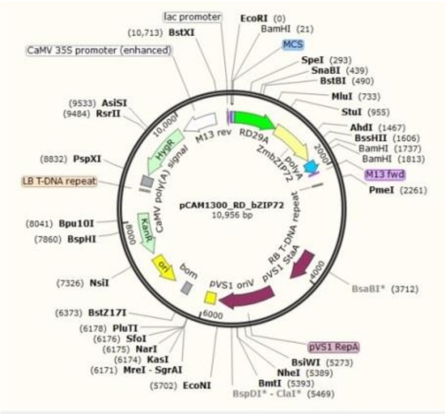
Trong nghiên cứu trước, nhóm tác giả đã phân lập đoạn gen *ZmbZIP72* từ giống ngô Tẻ vàng chất dạo của Việt Nam, đồng thời thiết kế vector mang gen *ZmbZIP72* này dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng stress RD29A để điều khiển gen *ZmbZIP72* và biến nạp vector tái tổ hợp này vào chủng *A.tumefaciens* [9]. Ở nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành chuyển cấu trúc đã thiết kế mang gen vào cây ngô thông qua *A.tumefaciens* chủng EHA105 nhằm tạo cây chuyển gen *ZmbZIP72* với sự điều khiển gen bởi một promoter mạnh-RD29A.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/RD29A-*ZmbZIP72* được thiết kế bởi Viện Nghiên cứu hệ gen [9]. Cấu trúc của vector mang gen *ZmbZIP72* được thể hiện trong sơ đồ hình 1. Phôi non từ giống ngô K7

dùng làm nguyên liệu cho chuyển gen được cung cấp từ Viện Nghiên cứu ngô là dòng đã được đánh giá có khả năng biến nạp gen tốt và có tính chịu hạn bình thường.



Hình 1. *Sơ đồ vector biểu hiện gen thực vật pCAM/RD29A-ZmbZIP72*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuyển gen vào phôi non ngô thông qua *A. tumefaciens:* được tiến hành theo phương pháp của Frame và cộng sự (2006) [10] có cải tiến cho phù hợp với nguồn vật liệu ngô K7 và điều kiện phòng thí nghiệm của nhóm tác giả. Thành phần môi trường và quy trình chuyển gen được thực hiện như đã mô tả ở công bố của Lưu Hàn Ly và cộng sự (2018) [11].

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây ngô: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Roger và cộng sự (1985) [12] nhưng có cải tiến cho phù hợp với mô lá ngô thành phần hóa chất, quy trình được thực hiện như đã mô tả ở công bố trước [11].

Nhân đoạn gen quan tâm bằng PCR: hiệu quả chuyển gen được đánh giá thông qua các thí nghiệm PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong hệ gen của cây ngô tái sinh. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi nhân gen chọn lọc kháng hygromycin được chúng tôi thiết kế có trình tự (Hpt_F5’-TACACAGCCATCGGTCCAGAC-3’, Hpt_R 5’-ATCGGCACTTTGCATCGG-3’) sẽ nhân đoạn 775 bp và mồi nhân gen đích ZmbZIP72 được thiết kế có trình tự (ZmbZIP72SacI_F 5'-ATGAGAGCTCATGGACGAGCTG-3', ZmbZIP72SacI_R 5'-TAATGAGCTCTCACCAGGGGGC -3') sẽ nhân đoạn 894 bp. Thành phần thực hiện các phản ứng khuếch đại bao gồm: 1X Buffer, 0,4 mM dNTPs, 1 mM $MgCl_2$, 0,4 mM mỗi mồi, 20 ng DNA genome và 2U Dream taq DNA polymerase (Thermofisher Scientific, Lithunia). Chu trình nhiệt PCR được cài đặt như sau: 95°C/3 phút; (95°C/30 giây, 50°C/45 giây, 72°/2 phút) x 30 chu kỳ; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% và nhuộm bằng ethidium bromide.

Các thí nghiệm chuyển gen và đánh giá các nguồn vật liệu chuyển gen được thực hiện trong điều kiện nhà lưới (khu thí nghiệm nhà lưới có cách ly bảo đảm an toàn sinh học). Theo dõi các chỉ tiêu thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới (có cách ly đảm bảo an toàn sinh học) của các nguồn ngô theo hướng dẫn của Trung tâm Cải tạo giống ngô và lúa mì quốc tế (CIMMYT).

3. Kết quả và thảo luận

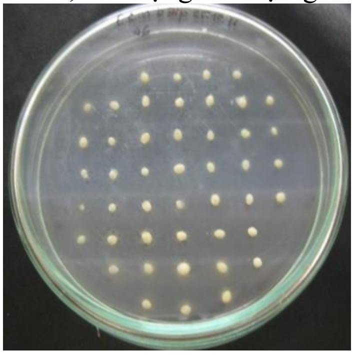
3.1. Đánh giá khả năng tái sinh cây từ phôi non sau chuyển gen

Sự thành công việc chuyển gen vào cây ngô thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefacien* phụ thuộc vào các yếu tố vi khuẩn (mật độ, chủng vi khuẩn, sự xâm nhiễm của chủng *Agrobacterium*...) và các yếu tố có liên quan đến thực vật (kiểu gen, dạng mẫu mô, kích thước mô, khả năng tái sinh của các tế bào sau khi lây nhiễm…), hệ thống môi trường nuôi cấy, các tác nhân chọn lọc. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành các thí nghiệm chuyển gen trên cơ sở áp dụng quy trình của Frame và cộng sự (2006) [10], Ishida và cộng sự (2007) [13], có chọn lọc, cải tiến để phù hợp với nguồn vật liệu ngô Việt Nam, cũng như điều kiện cơ sở vật chất, trang thiết bị, khí hậu mùa vụ của nước ta.

Với cây ngô, do là cây một lá mầm nên khả năng tái sinh gặp rất nhiều khó khăn, bên cạnh đó nguồn vật liệu ngô rất phong phú, để lựa chọn nguồn vật liệu cho tỷ lệ tái sinh cao,

phù hợp với điều kiện khí hậu Việt Nam là công việc đặc biệt quan trọng. Tại Viện Nghiên cứu Ngô, nhiều năm qua đã thực hiện các thí nghiệm nghiên cứu các thành phần môi trường và khả năng tái sinh của các nguồn vật liệu. Kế thừa kết quả từ những đề tài trước, dòng K7 là dòng thuần, thời gian sinh trưởng vụ xuân 110 ngày, vụ thu 105 ngày, cây thân to, dáng lá đứng, bắp màu vàng đá, lõi trắng, khả năng chống chịu các loại sâu đục thân, đục bắp, sâu xám ở điểm 1-2; chịu bệnh rỉ sắt và đốm lá ở điểm 1.

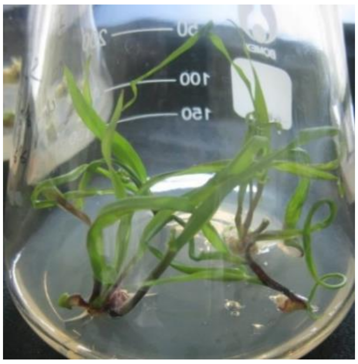
Gen *ZmbZIP72* đã thiết kế tạo cấu trúc pCAM/RD29A-*ZmbZIP72* được chuyển vào dòng ngô K7 thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens* trong hai vụ là thu đông 2016 và thu đông 2017. Các giai đoạn chính của quá trình chuyển gen vào phôi ngô thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được thể hiện trong hình 2. Phôi non sau 10-12 ngày được sử dụng làm mô đích để lây nhiễm với vi khuẩn *A. tumefacien* tái tổ hợp. Chất lượng phôi non là một yếu tố quan trọng nhất quyết định đến hiệu quả chuyển gen ngô, kích thước phôi là tiêu chí cho thấy sự phát triển tốt ở phôi. Phôi non cần có kích thước từ 1- 1,2 mm là thích hợp nhất cho chuyển gen [13]. Sau thời gian nuôi ủ 3 ngày, các phôi được cấy chuyển sang môi trường nuôi phục hồi với thời gian 7 ngày. Tiếp theo, mẫu được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc I (có bổ sung 15 mg/l hygromycin) và chọn lọc II (3 mg/l hygromycin) để tạo mô sẹo phôi hoá. Tuy nhiên, số lượng mô sẹo giảm dần, nhiều mô sẹo có hiện tượng hoại tử, chuyển màu nâu và chết đi trên môi trường chọn lọc có hygromycin. Nguyên nhân là do các vector chịu hạn có chứa gen quan tâm và gen chỉ thị chọn lọc hygromycin. Do đó, các tế bào thực vật mang gen chuyển nạp mới phát triển được trên môi trường nuôi cấy có hygromycin. Sau chọn lọc, số mô sẹo hình thành qua 2 đợt chuyển gen là 36,15% và 21,45% (Bảng 1). Tiếp theo, các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tái sinh và môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh (hình 2D, E) với tỷ lệ trung bình của 2 đợt chuyển gen là 84,7%. Tỷ lệ này là khá cao so với một số nghiên cứu tương tự được thực hiện trong nước trước đây của nhóm tác giả Trần Thị Lương và cộng sự (2014) [14] (trung bình đạt 39,15%), Huỳnh Thị Thu Huệ và cộng sự (2014) [15] (trung bình đạt 20,18%) hay Lưu Hàn Ly và cộng sự (2018) [11] (trung bình đạt 56%). Các cây tiếp tục được trồng trên môi trường đất trấu. Mặc dù tỷ lệ tạo chồi, tỷ lệ cây tạo rễ khá cao, tuy nhiên khi các cây hoàn chỉnh được trồng ra khu vực nhà lưới, tỷ lệ cây sống sót chỉ có 44 cây với vụ thu đông 2016 (2,66%) và 140 cây (6%) với vụ thu đông 2017. Nguyên nhân do cây ngô là cây dễ bị tổn thương bởi các yếu tố môi trường bất lợi như sâu bệnh và điều kiện thời tiết không thuận lợi. Tuy vậy, tỷ lệ cây sống sót cao hơn so với nghiên cứu của Lưu Hàn Ly và cộng sự (2018) (tỷ lệ 1,64% và 0,8%) [11]. Các cây chuyển gen được gắn thẻ theo dõi và thu mẫu lá để tiến hành kiểm tra ở mức phân tử.



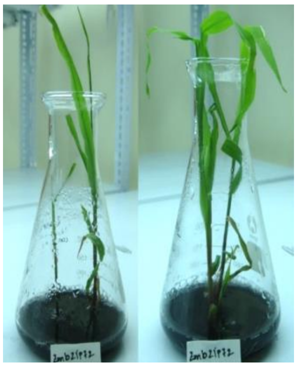
A

B

C



D



E

F

Hình 2. *Các giai đoạn phát triển của cây ngô T0 chuyển gen ZmbZIP72*

A: Phôi non sau một tuần nuôi cấy trên môi trường phục hồi có bổ sung kháng sinh vancomycin và cefotaxim; B: Mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc với kháng sinh hygromycin; C, D: Phôi soma tạo chồi trong môi trường tái sinh 2 có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng sau 1 tuần; E: Cây con hoàn chỉnh trong môi trường ra rễ; F: Cây được trồng trên đất trong nhà lưới.

Bảng 1. *Kết quả chuyển gen ZmbZIP72 từ cấu trúcpCAM/RD29A-ZmbZIP72*

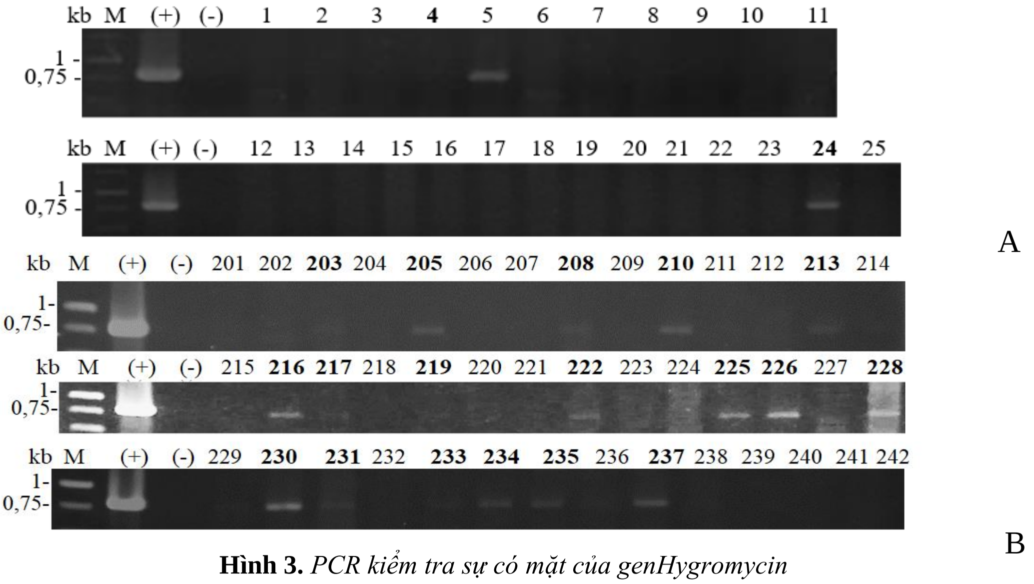
pCAM/RD29A-*ZmbZIP72*												
Vụ chuyển gen	**CCM**	**RE**	**Chọn lọc 1**	**Chọn lọc 2**	**Tái sinh**	**Số chồi**	**Ra rễ**	**Ra bầu đất trấu**	**Tỉ lệ so với số phôi**	**Số cây sống sót khi ra đất**	**Số cây T0 PCR (+) gen đích**	**Cây thu được hạt T1**
Thu 2016	1651	1142	1050	597	155	114	111	111	0,060	44	2	0
Thu 2017	2326	1950	1053	499	321	237	350	314	0,135	140	23	7

3.2. Phân tích cây chuyển gen bằng PCR

Trong nghiên cứu này trước tiên, nhóm tác giả đã tiến hành PCR với khuôn là DNA tổng số tách chiết từ các cây chuyển gen thế hệ T0 sử dụng cặp mồi nhân gen chỉ thị kháng Hygromycin (HptF/R). Sự có mặt của gen chỉ thị *Hygromycin* giúp cây có thể sống sót qua các giai đoạn chọn lọc trong nuôi cấy mô. Tuy nhiên, thực tế thì nhiều phôi vẫn có thể tái sinh dù không có gen kháng hygromycin. Vì vậy việc kiểm tra sự có mặt của gen chỉ thị bước đầu giúp xác định được quá trình chuyển gen có xảy ra hay không. Cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm PCR này khuếch đại vùng mã hóa của gen chỉ thị *Hygromycin* với kích thước lý thuyết là 775 bp. Qua ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR (Hình 3A,B), có thể thấy rằng mẫu đối chứng dương xuất hiện một băng khá đậm, rõ nét với kích thước 775 bp tương ứng với kích thước lý thuyết. Đối chứng âm không lên chứng tỏ phản ứng không bị tạp nhiễm. Đối với các mẫu thí nghiệm vụ thu đông 2016, hầu hết các mẫu đều không xuất hiện băng DNA nào, chỉ mẫu số 5 và 24 xuất hiện một băng đậm và rõ nét có kích thước bằng với đối chứng dương (Hình 3A). Với các mẫu thí nghiệm của vụ thu đông 2017, có 17 mẫu (số 203, 205, 208, 210, 213, 216, 217, 222, 225, 226, 228, 230, 231, 233, 234, 235, 237) xuất hiện băng có kích thước 775 bp (Hình 3B). Khi chuyển gen vào tế bào thực vật nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, đoạn T-DNA được chuyển vào nhờ bộ máy phân tử của vi khuẩn và tế bào thực vật. Đoạn T-DNA được thiết kế bao gồm cả cấu trúc biểu hiện RD29A-*ZmbZIP72*-35S và gen chỉ thị thực vật *Hygromycin*. Do đó, theo lý thuyết, cả cấu trúc biểu hiện và gen chỉ thị cùng được chuyển vào hệ gen của cây. Vì vậy, nhóm tác giả tiếp tục tiến hành các thí nghiệm PCR nhân đoạn gen đích *ZmbZIP72* để khẳng định sự thành công của việc chuyển cấu trúc biểu hiện gen *ZmbZIP72* vào cây ngô.

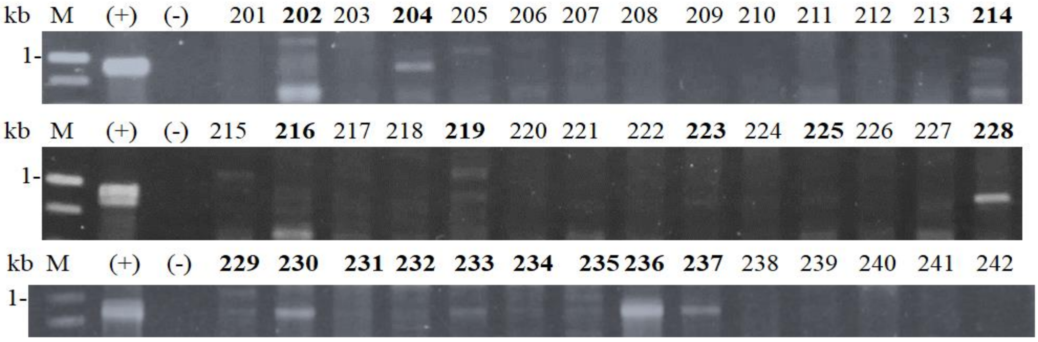
Để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện trong hệ gen cây chuyển gen, nhóm tác giả tiếp tục sử dụng phản ứng PCR với cặp mồi nhân đặc hiệu gen đích. Bởi vì gen *ZmbZIP72* là gen nội sinh ở ngô có kích thước 2164 bp, do đó, cặp mồi ZmbZIP72SacI_F/R được sử

dụng sẽ nhân đoạn gen chuyển có kích thước 894 bp là đoạn gen CDS của gen. Kết quả cho thấy với mẫu cây số 11 và 13 ở vụ thu đông 2016 đã xuất hiện dương tính với phản ứng PCR nhân gen kháng Hygromycin, tuy nhiên không dương tính với cặp mồi nhân gen *ZmbZIP72* (kết quả không đưa ra ở đây) và hai cây này không cho hạt T1. Với vụ thu đông 2017, các mẫu số 202, 204, 214, 216, 219, 223, 225, 228,237 xuất hiện sản phẩm PCR nhân đoạn DNA 894 bp như dự đoán. Các cây này tiếp tục được chăm sóc và theo dõi để thu hạt T1. Sau một thời gian, có 7 cây T0 (cây số 217, 219, 223, 229, 230, 231, 235) sinh trưởng bình thường, hữu thụ và cho hạt T1. Đây là các cây có dương tính với phản ứng nhân gen chỉ thị *Hyg* và gen đích *ZmbZIP72*. Như vậy, có thể thấy rằng cấu trúc mang gen *ZmbZIP72* đã được chuyển thành công vào các cây ngô thế hệ T0. Các dòng T1 sẽ được gieo trồng để đánh giá ở thế hệ tiếp theo.



Hình 3. *PCR kiểm tra sự có mặt của genHygromycin*

M: maker 1kb, (+): sản phẩm PCR của đối chứng dương với khuôn là plasmid pCAM/RD29A-ZmbZIP72, (-): Sản phẩm PCR từ H_2O, (A): Sản phẩm PCR của 33 mẫu DNA cây T0 chuyển gen vụ thu đông 2016; (B): Sản phẩm PCR của 42 mẫu DNA cây T0 chuyển gen vụ thu đông 2017.



Hình 4. *Sản phẩm PCR nhân gen ZmbZIP72 với cặp mồi ZmbZIP72SacI_R ở cây ngô T0 chuyển gen vụ thu đông 2017*

M: thang chuẩn DNA 1 kb; **(+)***: đối chứng dương với khuôn là plasmid pCAM/RD29A-ZmbZIP72;* **(-)***: đối chứng âm là nước; 201-242: sản phẩm PCR từ DNA cây ngô chuyển gen*

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã thực hiện chuyển gen *ZmbZip72* vào phôi non của dòng ngô K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*ở hai vụ thu đông 2016 và 2017. Kết quả thu được 44 cây sống sót trong vụ thu đông 2016, đạt tỷ lệ 2,66% và 140 cây sống sót trong vụ thu đông 2017,

đạt tỷ lệ 6%. Vụ thu đông năm 2016 có 2 cây dương tính với PCR nhân gen *Hygromycin*, tuy nhiên không có gen đích *ZmbZip72*. Trong vụ thu đông 2017, số cây chuyển gen có mặt cả gen đích *ZmbZip72* và gen chỉ thị *Hygromycin* là 17 cây chiếm tỉ lệ 12,14% trong tổng số cây sống sót trong nhà lưới.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp nhà nước "Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen" do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quản lý. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1]. K. Century, T. L. Reuber, and O. J. Ratcliffe, "Regulating the regulators: The future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products," *Plant Physiol*, vol. 147, pp. 20-29, 2008.

[2]. L. S. P. Tran, K. Nakashima, Y. Sakuma, S. D. Simpson, Y. Fujita, K. Maruyama, and K. Yamaguchi-Shinozaki, "Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter," *Plant Cell*, vol. 16, no. 9, pp. 2481-2498, 2004.

[3]. F. Qin, M. Kakimoto, Y. Sakuma, K. Maruyama, Y. Osakabe, L. S. Tran, K. Shinozaki, and K. Y. Shinozaki, "Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays L.*," *The Plant J.*, vol. 50, no. 1, pp. 54-69, 2007.

[4]. K. Wei, J. Chen, Y. Wang, Y. Chen, S. Chen, Y. Yina Lin, S. Pan, Zhong X., and D. Xie, "Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize," *DNA Res*, vol. 19, no. 6, pp. 463-476, 2012.

[5]. M. Jakoby, B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, and F. Parcy, "bZIP transcription factors in Arabidopsis," *Trends Plant Sci*, vol. 7, no. 3, pp. 106-111, 2002.

[6]. Z. Jin, W. Xu, and A. Liu, "Genomic surveys and expression analysis of bZIP gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.)," *Planta*, vol. 239, pp. 299-312, 2014.

[7]. L. Wang, C. Yin, X. Cheng, H. Wang, R. Guo, X. Xu, J. Zhao, Y. Zheng, and X. Wang, "Evolutionary and expression analysis of a MADS-box gene superfamily involved in ovule development of seeded and seedless grapevines," *Mol. Genet. Genomic*, vol. 290, pp. 825-846, 2015.

[8]. S. Ying, D. F. Zhang, J. Fu, Y. S. Shi, Y. C. Song, T. Y. Wang, and Y. Li, "Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis," *Planta*, vol. 235, no. 2, pp. 253-266, 2012.

[9]. T. H. Pham, H. H. Ha, T. L. Nguyen, T. T. H. Le, V. H. Nong, and T. T. H. Huynh, "Construction an expression vector and *Agrobacterium tumefaciens* strain carrying *Zm*bZIP72 gene isolated from maize," *J Biotechnology*, vol. 15, no. 2, pp. 333-340, 2017.

[10]. B. R. Frame, J. M. McMurray, T. M. Fonger, M. L. Main, K. W. Taylor, F. J. Torney, M. M. Paz, and K. Wang, "Improved Agrobacterium-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts," *Plant Cell Rep*, vol. 25, pp. 1024-1034, 2006.

[11]. H. L. Luu, T. T. H. Le, X. T. Nguyen, and T. T. H. Huynh, "Transformation of maize (*Zea mays* L.) using mannitol 1-phosphate dehydrogenase (mtlD) genes," *Vietnam J. Science, Technology and Engineering*, vol. 60, no. 9, pp. 59-64, 2018.

[12]. S. O. Rogers, and A. J Bendich, "Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues," *Plant Mol. Biol.*, vol. 5, pp. 69-76, 1985.

[13]. Y. Ishida, Y. Hiei, and T. Komari, "Agrobacterium-mediated transformation of maize," *Nat Protoc*, vol. 2, no. 7, pp. 1614-1621, 2007.

[14]. T. L. Tran, T. T. Nguyen, T. N. Nguyen, and D. T. Nguyen, "Transformation of Shrunken 2 (Sh2) gen to encode enzyme ADP-glucosepyrophosphorylase into some maize liens through *A. tumefaciens*," *J. Biology* vol. 36, no. 1, pp. 99-109, 2014.

[15]. T. T. H. Huynh, V. T. Nguyen, M. M. Bui, T. B. T. Doan, X. T. Nguyen, V. H. Nong, and M. C. Bui, "Construction Ti plasmid harbouring modiCSPB gene and transforming the gene in to maize plant," *J. Biotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 125-132, 2014.