

Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmDREB2A-S* tổng hợp nhân tạo và biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens*

Huỳnh Thị Thu Huệ^{1*}, Bùi Mạnh Minh¹, Đoàn Thị Bích Thảo²
Nông Văn Hải¹, Bùi Mạnh Cường²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 5.6.2015, ngày chuyển phản biện 10.6.2015, ngày nhận phản biện 8.7.2015, ngày chấp nhận đăng 13.7.2015

DREB2A (dehydration responsive element binding protein 2A) là một yếu tố phiên mã quan trọng tham gia vào phản ứng chịu hạn của thực vật nhờ khả năng tương tác với các tiểu đơn vị của ADN polymerase cũng như khả năng gắn bám đặc hiệu các yếu tố điều hòa dạng *cis* là DRE/CRT. Ở ngô, các biến đổi sau phiên mã sẽ tạo thành mARN *ZmDREB2A* dạng S, từ đó dịch mã tạo thành dạng protein có chức năng hoạt hóa các gen chống chịu hạn. Trong nghiên cứu này, đoạn gen tổng hợp nhân tạo *ZmDREB2A* dạng S có chứa vùng mang mã cho một protein đầy đủ gồm 318 axit amin đã được gắn vào vector pCAMBIA1300 để tạo vector chuyển gen có cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S terminator* nhằm mục đích biểu hiện gen liên tục trong cây, toàn bộ vector đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* tạo nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyển gen nhằm nâng cao tính chịu hạn ở thực vật.

Từ khóa: *A. tumefaciens*, gen *ZmDREB2A-S*, kháng hạn, ngô, pCAMBIA1300.

Chỉ số phân loại 4.6

CONSTRUCTION OF BINARY VECTOR CONTAINED ARTIFICIAL ZMDREB2A-S GENE AND TRANSFORMATION INTO AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Summary

DREB2A (dehydration responsive element binding protein 2A) is an important transcription factor involved in drought-inducible gene expression in plant. DREB2A proteins are able to bind regulatory elements DRE/CRT specifically as well as interact with the DNA polymerase subunits to form transcriptional complex. In *Zea mays*, the mRNA splicing process will create *ZmDREB2A-S* mRNA form, thus induce drought tolerance genes. In this study, the artificial *ZmDREB2A-S* gene which contains complete coding region for a functional protein consisting of 318 amino acids has been designed. The expression cassette *ubi:: ZmDREB2A-S::35S ter* was cloned into the pCAMBIA1300 vector and then introduced into *A. tumefaciens* cells to produce materials for further plant drought tolerance researches.

Keywords: *A. tumefaciens*, drought tolerance, pCAMBIA1300, *Zea mays* L., *ZmDREB2A-S* gene.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ở thực vật, các yếu tố điều hòa *cis* dạng DRE đóng một vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa các gen tham gia trong cơ chế cảm ứng chống hạn và lạnh. Sự biểu hiện của gen *DREB1A* và hai trình tự tương đồng của nó được cảm ứng bởi điều kiện nhiệt độ thấp, trong khi sự biểu hiện của gen *DREB2A* và các trình tự tương đồng của nó được cảm ứng bởi điều kiện khô hạn. Gen *DREB2A* được phân lập ở *Arabidopsis* là gen mã hóa cho protein bám trình tự DRE/CRT và được cảm ứng hoạt động bởi các stress áp suất thẩm thấu và điều kiện hạn [1]. Trong nghiên cứu gần đây, Sato và cộng sự đã công bố khả năng tương tác của protein *AtDREB2A* với tiểu đơn vị B3-1 của ADN polymerase II (DPB3-1) và các yếu tố nhân (NF-YA, NF-YB) để tạo nên phức hợp có thể hoạt hóa sự biểu hiện các gen đích của

*Tác giả chính: Email: hthue@igr.ac.vn; Tel: 0984630757

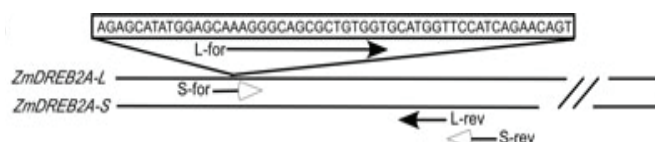
AtDREB2A tham gia vào quá trình chịu hạn [2].

Nghiên cứu DREB2 ở cây *Arabidopsis* cho thấy, vùng trung tâm của DREB2 có mang một vùng điều hòa âm tính và sự cắt bỏ vùng đó tạo nên protein DREB2A có hoạt tính (DREB2A-CA). Sự biểu hiện của DREB2A-CA ở cây *Arabidopsis* chuyển gen khi bị gây hạn cho thấy biểu hiện một loạt các gen chống hạn và chống stress nhưng cây có kiểu hình còi cọc. Khi DREB2A-CA được biểu hiện dung hợp với các protein phát huỳnh quang, chúng được quan sát thấy xuất hiện nhiều trong nhân [3]. Một số gen đích được hoạt hóa sau khi có sự hoạt động của DREB2A rất khác so với DREB1A, nguyên nhân là do sự khác nhau ở trình tự bám đặc hiệu của DREB2A so với DREB1A. Trình tự bám đặc hiệu của DREB1A là A/GCCGACNT trong khi DREB2A ưu tiên bám trình tự ACCGAC. Sự biểu hiện DREB2A-CA cũng cảm ứng biểu hiện một loạt các gen sốc nhiệt và làm tăng khả năng chống hạn của các cây chuyển gen [4]. Trong thập kỷ qua, các nghiên cứu chuyển gen *DREB2A* đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện trên nhiều đối tượng, với mục đích và quy mô khác nhau. Các nghiên cứu chuyển gen *ZmDREB2A* vào cây mô hình *Arabidopsis* đều mang lại kết quả nâng cao sức chịu hạn trên cây chuyển gen [5]. Năm 2014, Sadhukhan và cộng sự đã phân lập gen *VuDREB2A* trên đậu đũa (*Vigna unguiculata* L. Walp), tiến hành chuyển gen lên *Arabidopsis* và thu được các dòng cây chịu hạn [6].

Ở Việt Nam, trong thời gian qua đã có một số nghiên cứu chuyển gen nhằm nâng cao tính chịu hạn cho cây trồng như ngô, lúa, đậu tương. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thiết kế, tổng hợp và cải biến gen *CspB* có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*, mã hóa cho protein ARN chaperone có chức năng giúp cho các sợi mARN tồn tại bền vững ở dạng sợi đơn trong điều kiện môi trường khắc nghiệt và chuyển gen vào 3 dòng ngô Việt Nam V152N, C436 và C7N. Qua kết quả phân tích và đánh giá khả năng hữu thụ của cây chuyển gen cho thấy, đã chuyển thành công gen chịu hạn *modiCspB* với tần số chuyển gen vào các nguồn vật liệu đạt tỷ lệ trung bình là 0,56% [7]. Ngoài ra, năm 2009, Phạm Xuân Hội và cộng sự đã tiến hành phân

lập và giải trình tự yếu tố phiên mã *OsRAP2.4A* trên cây lúa, có trình tự tương đồng với *ZmDBF* trên ngô [8]. Đồng thời, Cao Lệ Quyên và cộng sự cũng phân lập được gen *OsDREB2A* trên cây lúa Mộc Tuyền (*MtOsDREB2A*), chuyển gen này vào cây lúa Chanh Trụi dưới sự điều khiển của Ubiquitin promoter và đã thu được 16 dòng chuyển gen có gen đích trong hệ gen [9]. Nguyễn Văn Đồng và cộng sự đã biến nạp thành công gen *GmMyb* một yếu tố điều hòa phiên mã liên quan đến tính chịu hạn vào giống đậu tương DT22 [10].

Ở cây ngô, tồn tại hai dạng mARN là *ZmDREB2A-L* và *ZmDREB2A-S*. Dạng *ZmDREB2A-L* có chiều dài 1.336 bp, chỉ mã hóa cho đoạn peptide có chiều dài 89 axit amin, chuỗi peptide không có domain ERF/AP2 gắn với ADN và dẫn đến hình thành dạng không có chức năng. *ZmDREB2A-S* có chiều dài 1.283 bp, mã hóa cho protein gồm 318 axit amin có các domain ERF/AP2 điển hình của các loại DREB nên là dạng có chức năng. Dạng S ngắn hơn dạng L 53 bp (hình 1), khi cây chịu stress thì xảy ra quá trình xử lý sau phiên mã mARN dạng *ZmDREB2A-L* bị cắt đi 53 bp để thành dạng *ZmDREB2A-S* có hoạt tính và khi bình thường thì đa phần mARN *ZmDREB2A* không bị cắt 53 bp và ở dạng *ZmDREB2A-L* [5]. Do vậy, dạng *ZmDREB2A-S* mới có vai trò trong việc chống chịu hạn cho cây ngô và chỉ được xuất hiện khi điều kiện môi trường hạn hán. Tuy nhiên, trong điều kiện hạn hán sự xuất hiện và duy trì của mARN *ZmDREB2A* dạng S diễn ra rất nhanh nên việc phân lập đoạn gen này trên các mẫu bị hạn gặp nhiều khó khăn, do vậy, việc tổng hợp nhân tạo đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S sẽ khắc phục được khó khăn trên.



Hình 1: sự khác biệt giữa *ZmDREB2A-L* và *ZmDREB2A-S* [5]

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế vector pCambia1300 mang gen *ZmDREB2A* dạng S tổng hợp nhân tạo trong cấu trúc biểu hiện có promoter ubiquitin và 35S terminator. Sau đó, vector tái tổ hợp

được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* để phục vụ cho mục đích chuyển gen.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các vector được sử dụng gồm: vector pUC57 mang gen *ZmDREB2A-S* được tổng hợp từ hãng Genscript (Hồng Kông), vector tách dòng trung gian pRTRA mang ubiquitin promoter đã được thiết kế dựa trên vector gốc pRTRA7/3 tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen (Viện Nghiên cứu hệ gen), vector pCAMBIA1300, chủng *A. tumefaciens* LBA4404 đã được lưu trữ tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen.

Cặp mồi để nhân đoạn gen *ZmDREB2A-S* được chúng tôi thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen *ZmDREB2A-S* mã số NM 001112406 và được tổng hợp từ hãng Genscript có trình tự như sau:

ZmDREB2AF1: 5' ACGGATCCATGACGCTGGATCAG 3'

ZmDREB2AR1: 5' ACTAGCGGCCGCGTTTAGCCGCTCC 3'

Phương pháp

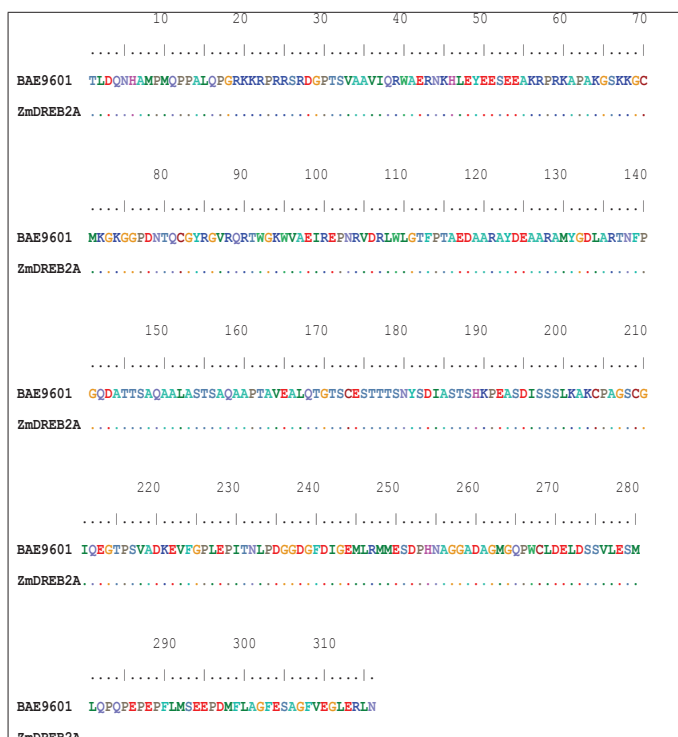
Các phương pháp sinh học phân tử như PCR, xử lý ADN plasmid với enzyme hạn chế, ghép nối gen với vector, biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn được thực hiện theo hướng dẫn của sách Cẩm nang phòng thí nghiệm theo Sambrook và Russell (2001).

Kết quả và thảo luận

Đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S được tổng hợp và tách dòng trong vector pUC57 tại hãng Genscript dựa theo công bố trên ngân hàng Genbank về gen *ZmDREB2A* dạng S với mã số NM 001112406. Đoạn gen tổng hợp có chứa đầy đủ nucleotide vùng CDS mã hóa cho 316 axit amin (hình 2) của protein chức năng *ZmDREB2A*. Trình tự amino axit suy diễn từ trình tự gen *ZmDREB2A* tổng hợp đã được so sánh với trình tự amino axit của *ZmDREB2A* trong Genbank (BAE9601) cho thấy, không có sự sai khác amino axit nào (hình 3) và đã tổng hợp được chính xác đoạn gen *ZmDREB2A* dạng S. Từ đó, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm lắp ghép gen *ZmDREB2A-S* vào các vector trung gian (pRTRA chứa ubiquitin promoter) và vector biểu hiện thực vật (pCAMBIA1300).

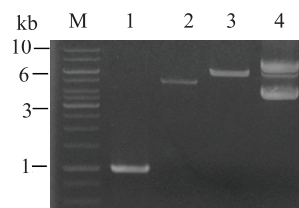
1	acg	ctg	gat	cag	aac	cat	gcc	atg	ccg	atg	cag	ccc	ccg	gcc	ctg
1	T	L	D	Q	N	H	A	M	P	M	Q	P	P	A	L
46	cag	ccc	gga	agg	aag	aag	cga	cct	cgc	aga	tca	cga	gat	ggg	cct
16	Q	P	G	R	K	K	R	P	R	R	S	R	D	G	P
91	acg	tca	gtg	gca	gct	gtc	atc	cag	ccg	tggt	gct	gag	cgc	aac	aag
31	T	S	V	A	A	V	I	Q	R	W	A	E	R	N	K
136	cat	ttg	gag	tat	gag	gaa	tct	gag	gag	gca	aag	cga	cca	aga	aaa
46	H	L	E	Y	E	E	S	E	E	A	K	R	P	R	K
181	gca	cct	gca	aag	ggg	tcg	aag	aag	ggc	tgt	atg	aag	gga	aaa	ggg
61	A	P	A	K	G	S	K	K	G	C	M	K	G	K	G
226	ggg	cct	gac	aat	act	caa	tgt	gga	tac	cgt	gga	gtg	agg	cag	cgt
76	G	P	D	N	T	Q	C	G	Y	R	G	V	R	Q	R
271	act	tggt	ggg	aag	tggt	ggt	gct	gaa	ata	aga	gag	cca	aat	cgt	gtc
91	T	W	G	K	W	V	A	E	I	R	E	P	N	R	V
316	gac	aga	ctc	tggt	ctg	ggg	acc	ttc	cca	acc	gcg	gag	gat	gca	gct
106	D	R	L	W	L	G	T	F	P	T	A	E	D	A	A
361	agg	gcc	tat	gac	gag	gca	gcc	aga	gcg	atg	tat	gga	gac	ttg	gca
121	R	A	Y	D	E	A	A	R	A	M	Y	G	D	L	A
406	cgg	act	aac	ttc	ccc	gga	cag	gat	gca	aca	acc	tct	gcc	caa	gct
136	R	T	N	F	P	G	Q	D	A	T	T	S	A	Q	A
451	gct	cta	gca	tcg	acc	tct	gcc	cag	gct	gct	cca	aca	gct	gtc	gaa
151	A	L	A	S	T	S	A	Q	A	A	P	T	A	V	E
496	gct	ctt	cag	act	ggc	acg	tca	tcg	gag	tcg	aca	acg	aca	tca	aat
166	A	L	Q	T	G	T	S	C	E	S	T	T	T	S	N
541	tac	tcg	gac	atc	gca	tcc	acc	tca	cac	aag	cct	gaa	gcc	tct	gac
181	Y	S	D	I	A	S	T	S	H	K	P	E	A	S	D
586	atc	tcg	agc	tcc	cta	aag	gca	aaa	tcg	cca	gct	gga	tca	tgt	ggg
196	I	S	S	S	L	K	A	K	C	P	A	G	S	C	G
631	atc	caa	gag	ggg	aca	ccc	agt	gta	gct	gac	aag	gag	gtc	ttt	ggg
211	I	Q	E	G	T	P	S	V	A	D	K	E	V	F	G
676	ccg	ttg	gag	cct	atc	aca	aat	ctt	cca	gat	ggg	ggg	gat	ggg	ttt
226	P	L	E	P	I	T	N	L	P	D	G	G	D	G	F
721	gat	atc	ggg	gag	atg	ctg	agg	atg	atg	gaa	agc	gat	cca	cat	aat
241	D	I	G	E	M	L	R	M	M	E	S	D	P	H	N
766	gca	ggg	gga	gct	gac	gct	ggc	atg	ggg	cag	ccc	tggt	tgt	ctt	gat
256	A	G	G	A	D	A	G	M	G	Q	P	W	C	L	D
811	gag	ctg	gat	tcg	agt	gtc	ttg	gag	agc	atg	ctc	cag	cca	cag	cca
271	E	L	D	S	S	V	L	E	S	M	L	Q	P	Q	P
856	gag	cca	gag	cca	ttc	ctg	atg	tct	gaa	gaa	ccg	gac	atg	ttt	ctt
286	E	P	E	P	F	L	M	S	E	E	P	D	M	F	L
901	gct	ggc	ttc	gaa	agc	gct	ggg	ttc	gtc	gag	ggg	ctg	gag	cgg	cta
301	A	G	F	E	S	A	G	F	V	E	G	L	E	R	L
946	aac														
316	N														

Hình 2: trình tự nucleotide và amino axit suy diễn của gen *ZmDREB2A*



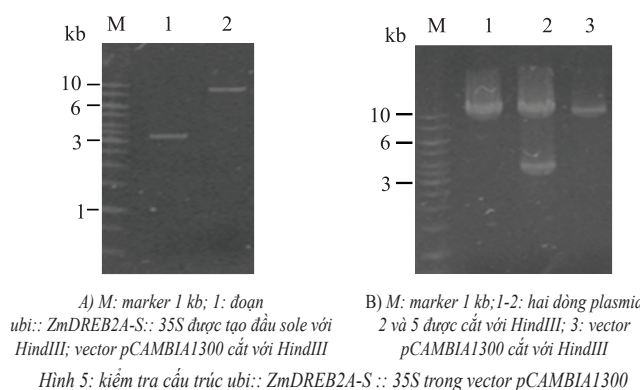
Hình 3: so sánh trình tự amino axit suy diễn của gen *ZmDREB2A* tổng hợp với trình tự amino axit của *ZmDREB2A* trong Genbank (BAE9601)

Với cặp mồi *ZmDREB2AF1* và *ZmDREB2AR1*, đoạn gen *ZmDREB2A-S* có kích thước 954 bp được nhân bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn ADN là pUC57 tái tổ hợp mang gen *ZmDREB2A-S*. Sau đó, đoạn gen *ZmDREB2A-S* được tạo đầu so le nhờ cắt với enzyme *BamHI* và *NotI* để thích hợp cho việc chèn vào vector trung gian pRTRA có kích thước khoảng 5 kb đã có chứa ubiquitin promoter cũng được mở vòng với *BamHI* và *NotI*. Hình điện di kiểm tra ADN trên gel agarose cho thấy, với kích thước đoạn gen *ZmDREB2A-S* là khoảng trên 900 bp (hình 4, đường chạy 1) và vector pRTRA đã có chứa ubiquitin promoter và 35S terminator là khoảng 5 kb (hình 4, đường chạy 2), vector pRTRA tái tổ hợp nếu được gắn thêm gen *ZmDREB2A-S* sẽ có kích thước khoảng 6 kb (hình 4, đường chạy 3) hiển thị sản phẩm được cắt mở vòng với *BamHI* của vector *pRTRA ubi:: ZmDREB2A-S::35S* là phù hợp với tính toán lý thuyết. Điều này cho thấy, chúng tôi đã thiết kế được cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* trong vector trung gian pRTRA. Toàn bộ cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* đã được xác định trình tự và so sánh với các trình tự gốc của *ubi* promoter, gen *ZmDREB2A-S* và 35S terminator, kết quả cho thấy các đoạn đã được ghép đúng trật tự và không có sự sai khác về nucleotide so với các trình tự gốc.



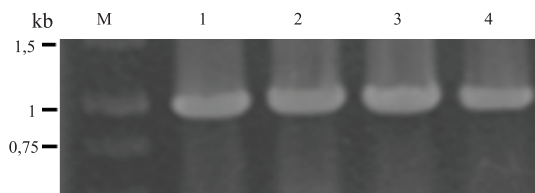
Hình 4: kiểm tra đoạn gen *ZmDREB2A-S* trong vector pRTRA7/3
Ghi chú: M: marker 1 kb; 1: sản phẩm PCR nhân *ZmDREB2A-S*; 2: pRTRA chứa ubiquitin promoter mở vòng với *BamHI* và *NotI*; 3: vector pRTRA *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* mở vòng với *BamHI*; 4: vector pRTRA *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S*

Để tạo vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmDREB2A-S*, toàn bộ cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* được cắt từ vector trung gian bằng *HindIII* có kích thước 3,2 kb và lai với vector pCAMBIA1300 cũng được mở vòng với *HindIII* có kích thước gần 9 kb (hình 5A). Sau khi biến nạp sản phẩm lai vào tế bào *E. coli*, chúng tôi thu được hai dòng plasmid số 2 và 5 cao hơn vector pCAMBIA1300 chưa tái tổ hợp. Hai dòng này được kiểm tra bằng cắt với *HindIII*, kết quả là dòng số 5 có đoạn chèn kích thước 3,2 kb tương ứng với tính toán về kích thước của cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* (hình 5B). Sau đó, plasmid này được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* để chọn tế bào tái tổ hợp với pCAMBIA1300 *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S*. Kết quả PCR nhân đoạn gen *ZmDREB2A-S* từ khuôn plasmid được tách từ 3 dòng *A. tumefaciens* sau biến nạp sử dụng cặp mồi *ZmDREB2AF1* và *ZmDREB2AR1* (hình 6) đã cho thấy, cả 3 dòng tế bào *A. tumefaciens* đều có chứa gen *ZmDREB2A-S* với kích thước khoảng 1 kb đúng theo tính toán lý thuyết.



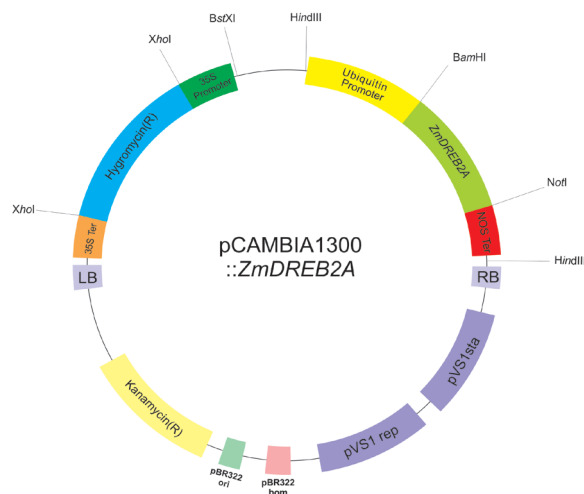
Hình 5: kiểm tra cấu trúc *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* trong vector pCAMBIA1300

Như vậy, gen *ZmDREB2A* dạng S đã được gắn vào trong cấu trúc có ubiquitin promoter và 35S terminator trong vùng T-ADN của vector pCAMBIA1300, vector chứa gen chỉ thị chọn lọc thực vật là hygromycin. Sơ đồ cấu trúc vector pCAMBIA1300 *ubi:: ZmDREB2A-S:: 35S* thể hiện ở hình 7.



M: marker 1 kb; 1-3: sản phẩm PCR từ plasmid; 4: đối chứng dương

Hình 6: PCR kiểm tra sự có mặt của gen ZmDREB2A-S trong vi khuẩn *A. tumefaciens*



Hình 7: sơ đồ vector pCambia1300 mang gen ZmDREB2A-S

Kết luận

Trong nghiên cứu này, đoạn gen tổng hợp nhân tạo *ZmDREB2A* dạng S có chứa đầy đủ vùng mang mã cho một protein gồm 318 axit amin đã được thiết kế trong vector pCambia1300 nằm trong cấu trúc *ubi::ZmDREB2A-S::35S*, vector này đã được biến nạp vào trong tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* phục vụ các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện tại Viện Nghiên cứu hệ gen với kinh phí của đề tài “Nghiên cứu chuyển gen nâng cao tính chịu hạn vào một số dòng ngô bố mẹ đang được áp dụng trong sản xuất” (mã số KC04.02/11-15) thuộc Chương trình nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ sinh học giai đoạn 2011-2015 do Viện Nghiên cứu ngô chủ trì. Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

[1] 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 ADN binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought - and low - temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, **10(8)**, pp.1391-1406.

[2] Sato H, Mizoi J, Tanaka H, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Morimoto K, Ohori T, Kusakabe K, Nagata M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014), “*Arabidopsis* DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits”, *Plant Cell*, **26(12)**, pp.4954-4973.

[3] Qin F, Sakuma Y, Tran L.S, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008), “*Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression”, *Plant Cell*, **20(6)**, pp.1693-1707.

[4] 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”, *Plant Cell*, **18(5)**, pp.1292-1309.

[5] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran L.S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007), “Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L”, *Plant J*, **50(1)**, pp.54-69.

[6] Sadhukhan A, Kobayashi Y, Tokizawa M, Yamamoto Y.Y, Iuchi S, Koyama H, Panda S.K, Sahoo L (2014), “*VuDREB2A*, a novel DREB2-type transcription factor in the drought-tolerant legume cowpea, mediates DRE-dependent expression of stress-responsive genes and confers enhanced drought resistance in transgenic *Arabidopsis*”, *Planta*, **240(3)**, pp.645-664.

[7] Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Văn Trường, Bùi Mạnh Minh, Đoàn Thị Bích Thảo, Nguyễn Xuân Thắng, Nông Văn Hải, Bùi Mạnh Cường (2014), “Thiết kế vector biểu hiện mang gen *modiCspB* và chuyển gen này vào cây ngô”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12(1)**, trang 125-132.

[8] Hoi P.X, Tu T.T (2009), “Identification and sequence analysis of a DREB subfamily transcription factor involve in drought stress tolerance from rice”, *Journal of Biology*, **31(4)**, pp.74-81.

[9] Cao Lê Quỳên, Trần Tuấn Tú và Phạm Xuân Hội (2009), “Nghiên cứu phân lập và chuyển gen điều khiển chịu hạn *MtOsDREB2A* vào giống lúa Chanh Trại thông qua *Agrobacterium*”, *Tạp chí Sinh học*, **31(2)**, trang 79-88.

[10] Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Nguyễn Hữu Kiên, Dương Tuấn Bảo (2013), “Khả năng kháng hạn và kháng thuốc trừ cỏ vào giống đậu tương DDT22”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*.