

CHUYỂN GEN MÃ HÓA CHALCONE ISOMERASE VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT51 THÔNG QUA *Agrobacterium tumefaciens*

Phạm Hải Yên¹, Lê Thị Hồng Trang^{1,2},
Hoàng Phú Hiệp¹, Nguyễn Hữu Quân¹, Chu Hoàng Mậu^{1*}

¹ Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên, ² Trường Cao đẳng Sư phạm Thái Nguyên

TÓM TẮT

Gen *Glycyne max* chalcone isomerase (*GmCHI*) mã hóa chalcone isomerase, một enzyme giữ vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp isoflavone ở đậu tương. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu chuyển gen *GmCHI* vào giống đậu tương ĐT51 và tái sinh cây đậu tương chuyển gen nhằm tăng cường biểu hiện gen *GmCHI* trong quá trình sinh tổng hợp isoflavone ở đậu tương. Chúng tôi sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* CV58 chứa vector chuyển gen *pCB301_GmCHI* được sử dụng để chuyển gen *GmCHI* vào giống đậu tương ĐT51. Các mẫu và chồi trong ống nghiệm được chọn trên môi trường chứa 50-75 mg/L kanamycin. Trong 225 mẫu biến nạp có 141 mẫu phát sinh chồi và tạo ra 354 chồi, trong đó có 196 chồi được chuyển sang môi trường kéo dài và 159 chồi chuyển sang môi trường ra rễ. Số cây đem trồng trên giá thể là 28 và trong số đó có 9 cây đậu tương chuyển gen phát triển bình thường trong nhà lưới. Kết quả phân tích PCR xác nhận được gen chuyển *GmCHI* có mặt trong hệ gen của 8 cây đậu tương chuyển gen T0. Hiệu suất chuyển gen đạt 3,56%.

Từ khóa: chuyển gen qua *Agrobacterium*, chalcone isomerase, đậu tương chuyển gen, gen *GmCHI*, isoflavone

MỞ ĐẦU

Isoflavone là một hợp chất có cấu tạo hóa học tương tự với estrogen ở người, được tìm thấy nhiều trong mầm đậu tương. Các dẫn xuất chính của isoflavone là daidzein, genistein và glycitein [2], [5] và các chất này chỉ khác nhau về nguyên tử hydro và các nhóm hydroxyl, ví dụ như, genistein và daidzein là hai dạng chính trong họ isoflavone, genistein chỉ khác daidzein ở nhóm hydroxyl liên kết với carbon số 5. Isoflavone có khả năng trung hòa các gốc tự do, trong số các isoflavone, genistein có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất [3]. Trong đậu tương, isoflavone được tổng hợp theo con đường phenylpropanol và được dự trữ trong không bào [11]. Genistein, daidzein và glycitein nói riêng và các isoflavone trong hạt đậu tương nói chung được tổng hợp bởi con đường phenylpropanoid [5]. Trong con đường phenylpropanoid, có hai enzyme chìa khóa quan trọng đó là chalcone isomerase (CHI) và isoflavone synthase (IFS). Enzyme CHI xúc tác phản ứng sinh tổng hợp daidzein và là

enzyme thứ hai trong con đường sản sinh flavonoid và xúc tác chuyển đổi chalcone thành flavanone (daidzein) – là nguyên liệu để tạo ra flavonoid và isoflavonoid [10]. Gen *CHI* được xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 20, hoạt động của gen *CHI* tổng hợp chalcone isomerase. Hiện nay đã có rất nhiều nghiên cứu quan tâm đến nhóm gen này và đã phát hiện gen *CHI* ở rất nhiều loài thực vật bậc cao như ích mẫu, cam, quýt, đinh lăng, cà chua, đậu xanh,... [7].

Đậu tương (*Glycine max* (L) Merr.) là cây thực phẩm quan trọng vì chứa nhiều chất dinh dưỡng có hàm lượng cao hơn hẳn so với các loại cây lương thực, cây thực phẩm khác. Đặc biệt, đậu tương có chứa các loại axit amin thiết yếu mà cơ thể người không thể tự tổng hợp được, như methionine, tryptophan, lysine,... [2]. Trong đậu tương có chứa hợp chất isoflavone có vai trò quan trọng đối với cơ thể người, nhất là phụ nữ. Tuy nhiên, hàm lượng isoflavone trong đậu tương rất thấp, chỉ khoảng 50 – 3000 µg/g [2], vì vậy hướng nâng cao hàm lượng isoflavone trong đậu tương bằng cách tăng cường hoạt động của enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng

* Tel: 0913 383289; Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

hợp isoflavone và chuyển gen nhằm biểu hiện mạnh gen để tăng hàm lượng enzyme chia khóa trong đậu tương đang được quan tâm nghiên cứu. Bài báo này trình bày kết quả chuyển gen mã hóa chalcone isomerase (*GmCHI*) vào giống đậu tương ĐT51 trong mục tiêu tăng cường biểu hiện gen *GmCHI* nhằm cải thiện hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống đậu tương ĐT51 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp làm vật liệu chuyển gen. Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 chứa vector chuyển gen *pCB301_GmCHI* do Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên cung cấp. Môi trường nuôi cấy có thành phần được thể hiện ở bảng 1.

Tạo nguyên liệu biến nạp gen: Hạt đậu tương khử trùng bằng khí clo tạo ra từ hỗn hợp javen 15 ml + HCl 5 ml đậm đặc rồi cho nảy mầm trên môi trường MS [8]. Sau 4 - 5 ngày, lá mầm được tách đôi, loại bỏ đỉnh sinh trưởng sử dụng làm nguyên liệu biến nạp gen và nuôi cấy *in vitro*.

Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm: Nuôi chọn lọc vi khuẩn trong 15 ml môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc là kanamycin 50

mg/l và rifamycin 50 mg/l ở 28°C, 200 rpm, 48 giờ. Chuyển 10 ml dịch huyền phù tế bào trên vào 50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi ở 28°C, 200 rpm đến khi OD600 nm = 0,6 - 0,8 là đạt số lượng tế bào tối ưu để biến nạp. Ly tâm dịch tế bào ở 4°C, 5000 rpm, 15 phút. Hoà tan tế bào lắng tạo huyền phù vi khuẩn vào 40 ml dung dịch môi trường CCM đặt trong nước đá lạnh.

Biến nạp cấu trúc *35S-GmCHI-cmyc-KDEL* vào đậu tương qua nách lá mầm được tiến hành theo Olhoft và cs (2006) [9].

Lây nhiễm và đồng nuôi cấy: Các mảnh lá mầm đậu tương được gây tổn thương bằng mũi dao nhọn vào phần nách lá mầm ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn trong thời gian 30 phút. Sau thời gian nhiễm khuẩn, mẫu được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc không kháng sinh. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25°C trong thời gian 5 ngày.

Cảm ứng tạo chồi trên môi trường SIM: Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được rửa trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM) có bổ sung 400 cefotaxim mg/l với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Đặt mẫu lên môi trường tạo chồi SIM có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l (lần 1). Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 75 mg/l (lần 2).

Bảng 1. Thành phần các môi trường trong tái sinh cây đậu tương

Môi trường	Thành phần
Nảy mầm (MS)	Muối B ₅ (3,052 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,8 + vitamin B ₅ (1 mg/l).0
Đồng nuôi cấy (CCM)	Muối B ₅ (0,316 g/l) + MES (3,9 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,4. Bổ sung trong box vitamin B ₅ (1 mg/l) + acetosyringon (0,2 mM) + L-cystatin (400 mg/l) + sodium thiosulfate (200 mg/l) + DTT (154 mg/l) + GA ₃ (0,25 mg/l) + BAP (2,5 mg/l)
Cảm ứng tạo chồi (SIM)	-Môi trường SIM lần 1: Muối B ₅ (2,0 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B ₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l - Môi trường SIM lần 2: Muối B ₅ (3,052 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), PH = 5,6. Bổ sung vitamin B ₅ (1 mg/l) + BAP (3,5 mg/l) + 400 mg/l + kanarmycine 75 mg/l
Kéo dài chồi (SEM)	MS (4,3 g/l) + MES (0,6 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung trong box vitamin B ₅ + L-asparagine + L-pyron glutamic acid + IAA (0,1 mg/l)+ GA ₃ (0,5 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l
Tạo rễ (RM)	MS (1,58 g/l) + MES (0,59 g/l) + đường (30 g/l) + agar (9 g/l), pH = 5,6. Bổ sung IAA (0,5 mg/l)+ vitamin B ₅ (1 mg/l) + cefotaxim 400 mg/l + kanarmycine 50 mg/l

Kéo dài chồi: Sau 2 - 3 tuần, các cụm chồi sống sót trên môi trường chọn lọc được loại bỏ lá mầm và chuyển sang môi trường phát triển kéo dài chồi (SEM) có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l.

Tạo rễ: Khi các chồi phát triển đạt kích thước từ 3 - 4 cm sẽ được chuyển sang môi trường tạo rễ (RM) có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l để tạo cây hoàn chỉnh.

Cây ra giá thể: Những cây hoàn chỉnh, cứng cáp được đưa ra bầu trấu hun : cát (tỷ lệ 1 : 1). Sau khoảng 1 - 2 tuần, các cây sống sót được trồng ra nhà lưới.

Phân tích cây đậu tương chuyển gen: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Edwards (1991) [4]. Tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *GmCHI-NcoI-F/GmCHI-cmyc-SacI-R* có trình tự nucleotide là: *GmCHI-NcoI-F*:

5'
CATGCCATGGATGGCAACGATCACCG
CGGTT 3'

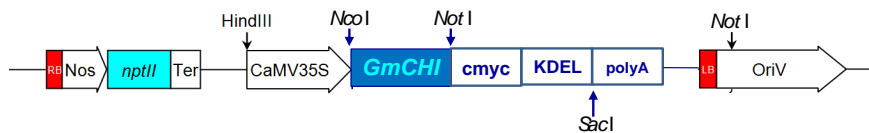
GmCHI-cmyc-SacI-R:

5'
CCGAGCTCCTAGAGTTCGTCTTTGGAA
CC 3'

Đoạn gen chuyển được nhân bản có kích thước dự kiến là 702 bp. Phản ứng PCR nhân bản gen *GmCHI* có chu kỳ nhiệt là 94°C trong 4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ là 94°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/90 giây và 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

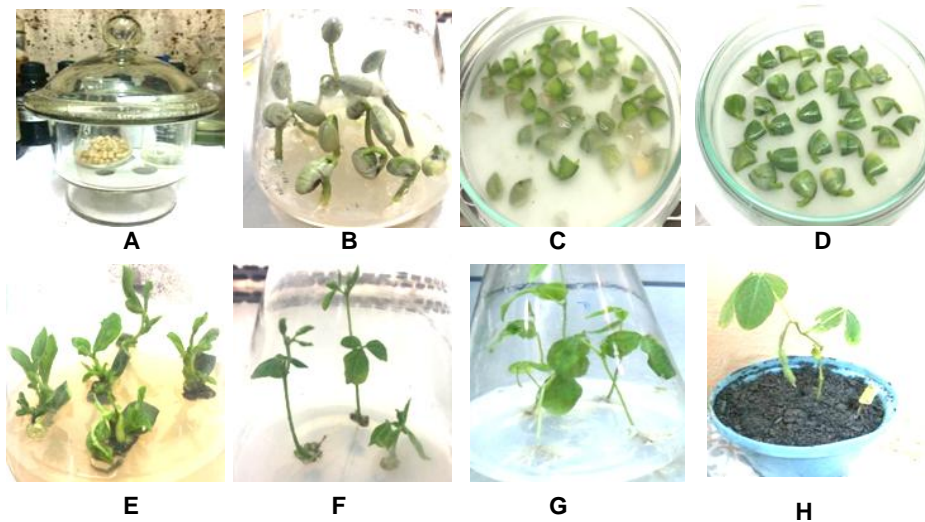
Chuyển cấu trúc 35S-*GmCHI-cmyc* vào giống đậu tương ĐT51 nhờ *A. tumefaciens* và tạo cây đậu tương chuyển gen



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc 35S-*GmCHI-cmyc* trong vector chuyển gen pCB301. *GmCHI* trong vi khuẩn *A. tumefaciens*. *nptII*: gen kháng kanamycin; *CaMV35S*: promoter 35S; *GmCHI*: gene mã hóa chalcone isomerase phân lập từ cây đậu tương; *cmyc*: trình tự nucleotide mã hóa peptide cmyc; *KDEL*: trình tự nucleotide mã hóa peptide KDEL

Vector chuyển gen *pCB301-GmCHI* chứa mang gen chuyển *GmCHI* (Hình 1) được phân lập từ một số giống đậu tương khác nhau về hàm lượng isoflavone [1]. *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector pCB301 mang cấu trúc 35S-*GmCHI-cmyc-KDEL* được làm mới bằng nuôi trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin và nuôi phục hồi khi mật độ tế bào đạt giá trị OD_{600nm} là 0,8 tạo dịch huyền phù phục vụ cho lây nhiễm.

Hạt đậu tương được khử trùng khô bằng khí clo trong bình hút chân không trong 14 - 16h, sau đó cho nảy mầm trong môi trường MS, khi chồi mầm đạt được kích thước 1,5-2 cm thì cắt bỏ rễ mầm, chồi mầm, vỏ và thu lá mầm, tách đôi lá mầm để làm vật liệu nhận gen. Các mảnh lá mầm được gây tổn thương và ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn 30 phút để lây nhiễm. Các mẫu sau đó được đưa sang môi trường đồng nuôi cấy 3 ngày trong tối. Sau 3 ngày, mẫu được rửa trong môi trường SIM lỏng cùng với cefotaxim 400 mg/l và đặt lên môi trường cảm ứng tạo đa chồi SIM trong 3 tuần. Khi các mẫu phát sinh cụm chồi gồm các chồi nhỏ, tiến hành cắt bỏ lá mầm và chuyển sang môi trường chọn lọc kéo dài chồi SEM. Các chồi nhỏ sống sót kéo dài trên môi trường SEM có kháng sinh chọn lọc kanamycin được chuyển sang môi trường ra rễ RM và sau đó là đem trồng trên giá thể. Cây tái sinh được đưa ra nhà lưới và chăm sóc để ra hoa, quả và thu hạt, phục vụ phân tích cây chuyển gen (Hình 2). Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *GmCHI* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* qua nách lá mầm hạt chín được trình bày ở bảng 2.



Hình 2. Hình ảnh biến nạp và tái sinh cây đậu tương chuyển gen ở giống ĐT51. A: Khử trùng hạt bằng khí clo; B: Hạt nảy mầm trên môi trường MS; C: Gây tổn thương rách lá mầm trong dịch khuẩn và lấy nhiễm; D: Đồng nuôi cây trên môi trường CCM; E: Tái sinh đa chồi trong môi trường chọn lọc SIM; F: Kéo dài chồi SEM; G: Ra rễ trên môi trường RM; H: Cây đậu tương chuyển gen trồng trên giá thể

Bảng 2. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển GmCHI vào giống đậu tương ĐT51

Đối chứng và thí nghiệm	Tổng số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi tái sinh	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây đem trồng trên giá thể	Số cây sống sót trong nhà lưới	
ĐC0*	50	0	0	0	0	0	0	
ĐC1*	50	50	112	57	30	18	10	
Thí nghiệm	Lần 1	100	60	130	76	58	11	4
	Lần 2	75	49	126	65	51	9	3
	Lần 3	50	32	98	55	50	8	2
<i>Tổng</i>	<i>225</i>	<i>141</i>	<i>354</i>	<i>196</i>	<i>159</i>	<i>28</i>	<i>9</i>	

Ghi chú: ĐC0* là mầm đậu xanh không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1* là mầm đậu xanh không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh

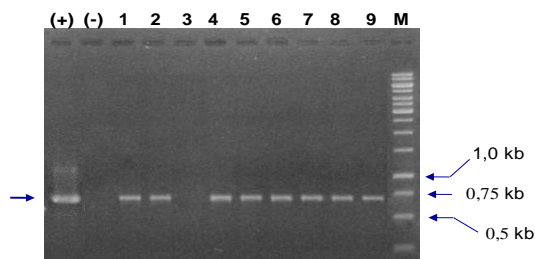
Hiệu quả chuyển gen phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như vật liệu chuyển gen, vector chuyển gen, thời gian, thao tác của người chuyển gen, hóa chất, thiết bị. Ở thí nghiệm này, hạt đậu tương được nuôi cấy trong môi trường MS từ 3-4 ngày, là thời điểm tiến hành tách đôi lá mầm để dùng kim nhọn gây tổn thương rách lá mầm giúp cho mẫu sản sinh ra các hợp chất phenolic có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn, làm tăng cường khả năng xâm nhiễm của *A. tumefaciens* vào mô đậu tương. Ngoài ra, tổ hợp các chất có chứa thiol (L-cysteine, dithiothreitol và sodium thiosulfate) được bổ sung vào môi trường đồng nuôi cây CCM giúp làm tăng khả năng gắn T-DNA vào hệ

gen thực vật và do đó tăng hiệu quả chuyển gen. Thí nghiệm với tổng số mẫu biến nạp là 225 mẫu, lặp lại 3 lần kết quả thu được 141 mẫu phát sinh chồi và cho 354 chồi, trong đó có 196 chồi sinh trưởng tốt trong môi trường kéo dài chồi SEM có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Khi chuyển sang môi trường ra rễ thu được 159 chồi phát sinh rễ và số cây đem trồng trên giá thể là 28 cây và 9 cây đậu tương chuyển gen phát triển bình thường trong nhà lưới. Song song với lô thí nghiệm chuyển gen *GmCHI*, hai lô đối chứng không chuyển gen cũng được nuôi cấy trong các môi trường tạo chồi, ra rễ. Ở lô ĐC0, lá mầm đậu tương không chuyển gen tái sinh trên môi

trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh, kết quả thu được là tất cả số mầm đều không phát sinh chồi và chết, còn ở lô ĐC1, lá mầm đậu tương không chuyển gen tái sinh trên môi trường chọn lọc không bổ sung kháng sinh, kết quả thu được cả 50 mầm đều tạo chồi, 57 chồi kéo dài, 30 chồi ra rễ và 10 cây được trồng trong nhà lưới làm đối chứng.

Xác định sự có mặt của gen chuyển trong cây đậu tương chuyển gen

DNA tổng số tách từ lá non của 9 cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 và cây đối chứng không chuyển gen trong nhà lưới được sử dụng cho PCR khuếch đại cấu trúc *GmCHI-cmyc-KDEL* với cặp mồi đặc hiệu *GmCHI-NcoI-F/GmCHI-cmyc-SacI-R*, kết quả thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *GmCHI-cmyc-KDEL* từ các cây đậu tương chuyển gen và cây không chuyển gen với cặp mồi *GmCHI-NcoI-F/GmCHI-cmyc-SacI-R*. (+) Sản phẩm PCR từ vector *pCB301-GmCHI*; (-): Kết quả PCR từ cây không chuyển gen; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: Kết quả PCR từ các cây đậu tương chuyển gen T0; M; thang DNA 1 kb

Sản phẩm điện di ở hình 3 cho thấy, trong 9 cây đậu tương chuyển gen T0 phân tích đã thu được 8 cây cho kết quả PCR nhân đoạn *GmCHI-cmyc-KDEL* từ hệ gen có kích thước khoảng 0,7kb. Hiệu quả chuyển gen ở giai đoạn T0 đạt 3,56% (8/225). Gen *GmCHI* nội tại có kích thước 657 bp [1], [6], cấu trúc *GmCHI-cmyc-KDEL* có kích thước 702 bp và khi khuếch đại bằng PCR với cặp mồi *GmCHI-NcoI-F/GmCHI-cmyc-SacI-R* thu được đoạn DNA có kích thước khoảng 700 bp (Hình 3). Như vậy bước đầu có thể nhận xét rằng gen chuyển *GmCHI* đã xâm nhập vào hệ gen cây đậu tương được chuyển gen. Tuy

nhien, gen chuyển *GmCHI* có hợp nhất vào hệ gen và có biểu hiện ở cây đậu tương hay không cần phải tiếp tục phân tích bằng Southern blot, Western blot.

KẾT LUẬN

Đã chuyển thành công gen *GmCHI* vào giống đậu tương ĐT51 nhờ *A.tumafaciens* qua nách lá mầm. Trong 225 mẫu biến nạp có 141 mẫu phát sinh và tạo 354 chồi. Kết quả chọn lọc bằng kháng sinh thu được 196 chồi sống sót trong môi trường SEM và có 159 chồi sống sót và ra rễ trong môi trường RM. Số cây đem trồng trên giá thể là 28 và có 9 cây đậu tương chuyển gen phát triển bình thường trong nhà lưới. Gen chuyển *GmCHI* có mặt trong hệ gen của 8 cây đậu tương chuyển gen T0 đã được xác nhận bằng kết quả phân tích PCR. Hiệu suất chuyển gen đạt 3,56%. Cần có những nghiên cứu tiếp theo để phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *GmCHI* trong các thế hệ T1, T2,...

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ và trong khuôn khổ của Đề tài cấp Bộ Giáo dục & Đào tạo mang mã số B2016-TNA-18 do TS. Hoàng Phú Hiệp làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Hồng Trang, Trần Thị Thanh Vân, Hồ Mạnh Tường, Phạm Thanh Tùng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Mậu (2016), “Đặc điểm của gen *GmCHI* phân lập từ một số giống đậu tương khác nhau về hàm lượng isoflavone”, *Tạp chí Sinh học* 38(2), tr. 236-242.
2. Ciabotti S., Silva A. C. B. B., Juhasz A. C. P., Mendonça C. D., Tavano O. L., Mandarino J. M. G. and Gonçalves C. A. A. (2016), “Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colors”, *Int. Food Res. J.*, 23(2), pp. 621-629
3. Chen M., Zhu W. J., You X., Liu Y. D., Kaleri G. M., Yang Q. (2015), “Isolation and characterization of a chalcone isomerase gene promoter from potato cultivars”, *Genetics and Molecular Research*, 14(4), pp. 18872-18885.
4. Edwards K., Johnstone C. and Thompson C. (1991), “A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis”, *Nucleic acids research*, 19, pp.1349.

5. Gutierrez-Gonzalez J. J., Guttikonda S. K., Tran L. S., Aldrich D. L., Zhong R., Yu O., Nguyen H. T., Sleper D. A. (2010), "Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits", *Plant Cell Physiol.*, 51(6), pp. 936-948.
6. Le T. H. T., Ho T. M., Hoang H. P., Le S. V. and Chu M. H. (2016), *Glycine max mRNA for chalcone isomerase RNA (chalcone isomerase (CHI) gene), cultivar DT51. GenBank: LT594995.1*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LT594995.1>
7. Mehran Dastmalchi, Sangeeta Dhaubhadel (2015), "Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family", *Planta*, 241, pp. 507-523.
8. Murashige T., Skoog F. (1962), "A revised medium growth and biosynthesis with tobacco tissue culture", *Physiol Plant*, 15, pp. 473-497.
9. Olhoft P. M., Donovan C. M., Somers D. A. (2006), "Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants", *Methods Mol. Biol.*, 343, pp. 385 - 396.
10. Wang R. K., Zhan S. F., Zhao T. J., Zhou X. L., Wang C. E. (2015), "Positive selection sites in tertiary structure of Leguminosae Chalcone isomerase 1", *Genetics and molecular research: GMR*, 14(1), pp.1957-1967.
11. Wenbo Giang, Qinggang Yin, Ranran Wu, Guangshun Zheng, Jinyue Liu, Richard A. Dixon, Yongzhen Pang (2015), "Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*", *J. Exp. Bot.*, 66(22), pp.7165-7179.

SUMMARY

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF DT51 SOYBEAN CULTIVAR WITH THE GENE ENCODING CHALCONE ISOMARASE

**Pham Hai Yen¹, Le Thi Hong Trang^{1,2},
Hoang Phu Hiep¹, Nguyen Huu Quan¹, Chu Hoang Mau^{1*}**
¹TNU-University of Education; ²Thai Nguyen College of Education

The *Glycine max* chalcone isomerase (*GmCHI*) gene encodes chalcone isomerase, which is key a enzyme that play an important role in isoflavone biosynthesis in soybean. We carried out this study to transfer the *GmCHI* gene into DT51 soybean cultivar and regenerate transgenic soybean plants which were used for further studies of the *GmCHI* gene overexpression. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 harboring the transgenic vector *pCB301_GmCHI* was used to transfer the *GmCHI* gene into DT51 soybean cultivar. Transformed shoots were selected on selection medium containing 50-75 mg/L of kanamycin. There were 354 shoots arised from 141 explants of 225 transformation explants in total, in which 196 buds were transferred to prolonged medium and 159 shoots transferred to rooting medium. The transgenic plants planted on substrates were 28 and among them 9 transgenic soybean plants developed normally in the greenhouse. The presence of the *GmCHI* gene into transgenic soybean plants was confirmed by PCR and transformation efficiency was 3.56%.

Keywords: *Agrobacterium-mediated transfection, chalcone isomerase, GmCHI gene, isoflavone, transgenic soybean*

Ngày nhận bài: 19/9/2017; Ngày phản biện: 8/10/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

* Tel: 0913 383289; Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn