

ASSESSMENT OF THE PRESENCE AND EXPRESSION OF *ZmLEA14A* GENE IN TRANSGENIC MAIZE

Huynh Thi Thu Hue^{1,2*}, Nguyen Thuy Linh¹, Dinh Truong Son³

¹Institute of Genome Research – VAST, ²Graduate University of Science and Technology – VAST

³Vietnam National University of Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 04/7/2022	Maize is one of the important crops which is widely used in biology and genetic research. The <i>LEA</i> gene family was predicted to have 32 members and was classified into 9 groups including: <i>LEA1</i> , <i>LEA2</i> , <i>LEA3</i> , <i>LEA4</i> , <i>LEA5</i> , <i>LEA6</i> , <i>SMP</i> , <i>Dehydrin</i> , and <i>AtM</i> . The <i>Lea14A</i> gene is among the group 5C, the protein <i>Lea14A</i> could help cell resistance for plants. Therefore, the enhancement of <i>Lea14A</i> gene expression may increase drought tolerance in plants that has potential for agricultural applications. This study was conducted to evaluate the presence of transgene and its expression at RNA and protein levels in <i>ZmLea14A</i> transgenic maize from T0 to T2 generation. K7 variety maize was used for transferring <i>ZmLEA14A</i> gene via <i>A. tumefaciens</i> . The results showed that the <i>ZmLEA14A</i> gene was stably transmitted to the T2 generations. Gene expression and protein level of <i>ZmLEA14A</i> were demonstrated by RT-PCR and Western hybridization. The transgenic lines would be a useful materials for further studies to create drought tolerant maize.
Revised: 27/8/2022	
Published: 30/8/2022	
KEYWORDS	
LEA protein	
Maize	
Plant transformation	
<i>ZmLEA14A</i>	
Drought tolerance	

ĐÁNH GIÁ SỰ DUY TRÌ VÀ BIỂU HIỆN GEN *ZmLEA14A* Ở CÂY NGÔ CHUYỂN GEN

Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2*}, Nguyễn Thùy Linh¹, Đinh Trường Sơn³

¹Viện nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 04/7/2022	Ngô là cây lương thực chính trong nông nghiệp nước ta và được nghiên cứu ứng dụng cũng như nghiên cứu cơ bản khá nhiều. Họ <i>LEA</i> được dự đoán gồm 32 gen trên toàn hệ gen ngô và bao gồm 9 nhóm: <i>LEA1</i> , <i>LEA2</i> , <i>LEA3</i> , <i>LEA4</i> , <i>LEA5</i> , <i>LEA6</i> , <i>SMP</i> , <i>Dehydrin</i> và <i>AtM</i> . Protein do gen <i>Lea14A</i> mã hóa nằm trong số các protein <i>LEA</i> nhóm 5C và là protein có chức năng giúp tăng khả năng chống chịu của tế bào. Vì vậy, việc tăng cường biểu hiện gen <i>ZmLea14A</i> nhằm mục đích tăng chống chịu cho cây, hứa hẹn tạo tính trạng tốt cho cây trồng nói chung. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá sự có mặt của gen <i>ZmLea14A</i> , sự phiên mã và dịch mã của gen <i>ZmLea14A</i> ở cây ngô chuyển gen. Sử dụng giống ngô K7 làm vật liệu để chuyển gen <i>ZmLEA14A</i> nhờ vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang cấu trúc 35S- <i>ZmLEA14A</i> . Kết quả cho thấy gen <i>ZmLEA14A</i> duy trì ổn định qua các thế hệ T0 đến T2. Sự phiên mã và dịch mã của gen <i>ZmLEA14A</i> được chứng minh bằng các phương pháp RT-PCR và lai Western. Các cây ngô chuyển gen <i>ZmLEA14A</i> sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo dòng ngô chịu hạn.
Ngày hoàn thiện: 27/8/2022	
Ngày đăng: 30/8/2022	
TỪ KHÓA	
Protein LEA	
Ngô	
Chuyển gen	
<i>ZmLEA14A</i>	
Chịu hạn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6225>

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

1. Giới thiệu

Protein LEA là một nhóm lớn, rất đa dạng và có chức năng bảo vệ thành tế bào thực vật trong điều kiện mất nước. Khi cây gặp điều kiện cực đoan như hạn, lạnh, mặn, đã phát hiện thấy protein này được dự trữ một lượng lớn trong hạt và các cơ quan sinh trưởng [1], [2]. Nghiên cứu đặc điểm cấu trúc protein LEA và tính chất biểu hiện cho thấy vai trò quan trọng của protein này liên quan đến tính chịu hạn của cây [3]. Nghiên cứu trên cây đậu và lúa chuyển các gen LEA đã được thực hiện nhằm nâng cao tính chống chịu hạn cho các đối tượng này [1], [4].

Cây ngô là một trong những cây lương thực quan trọng, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền và sinh học cơ bản. Họ gen *LEA* được dự đoán gồm 32 gen trong hệ gen ngô và bao gồm 9 nhóm: *LEA1*, *LEA2*, *LEA3*, *LEA4*, *LEA5*, *LEA6*, *SMP*, *Dehydrin* và *AtM*. Năm 2016, Li và Cao đã thực hiện nghiên cứu phân tích, so sánh về sự phiên mã của họ gen *LEA* ở ngô, từ đó, xác định được 32 gen *LEA* ở cây trồng này. Ở mỗi nhóm, trình tự gen và domain chính trong các gen *LEA* có tính bảo toàn cao. Theo đó, trên 10 nhiễm sắc thể (NST) có sự phân bố toàn bộ 32 gen nhưng không đồng đều giữa các nhiễm sắc thể. Có 7 gen *LEA* trên NST số 8, 6 gen *LEA* trên NST số 1, 5 gen trên NST số 6, 4 gen trên NST số 3, trên NST số 2 và 4 đều có 1 gen *LEA*. Tám gen *LEA* nữa nằm trên các NST 5, 7, 9 và 10. Gen *Lea14A* nằm trong số các protein LEA nhóm 5C và là protein có chức năng giúp tăng chống chịu của tế bào [5]. Vì vậy, việc tăng cường biểu hiện gen *ZmLea14A* cho cây ngô chuyển gen hứa hẹn về việc tạo giống ngô có khả năng chống chịu trong sản xuất. Trong nghiên cứu trước, gen *ZmLea14A* được phân lập từ dòng ngô địa phương Tè vàng, là giống ngô có khả năng chịu hạn. Gen có kích thước vùng CDS là 456 bp và được thiết kế nằm trong cấu trúc có sự điều khiển gen bằng promoter 35S [6]. Cấu trúc này đã được kiểm tra sự biểu hiện trên cây thuốc lá chuyển gen và khẳng định hoạt động tốt trên cây thuốc lá [7].

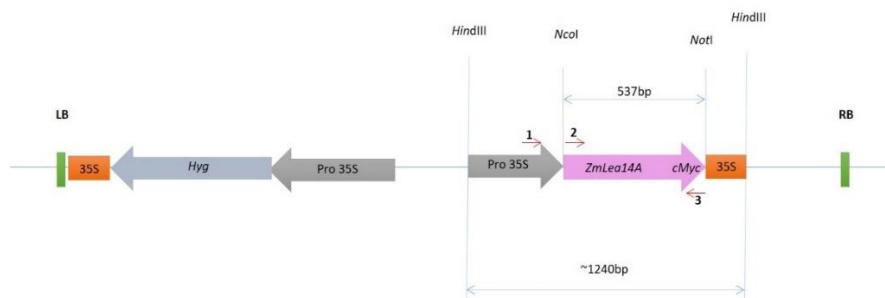
Trong công bố này, chúng tôi nghiên cứu đánh giá cây ngô chuyển gen *ZmLea14A* thông qua *Agrobacterium tumefaciens* từ thế hệ T0 đến T2 bằng các kỹ thuật PCR, RT-PCR và lai Southern, lai Western nhằm kiểm tra sự ổn định của gen chuyển và sự phiên mã, dịch mã của gen *ZmLea14A* ở cây ngô chuyển gen.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Dòng ngô K7 chuyển gen được tạo ra từ các thí nghiệm chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào phôi non ngô theo Frame và cộng sự 2006 [8] được thực hiện tại Phòng Đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen.

Cấu trúc chứa gen *ZmLea14A* từ vùng RB đến LB trên Ti plasmid pCambia1300 được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc từ LB đến RB vector pCAM/35S-ZmLEA14A
cấu trúc gen đích [CaMV35S promoter + *ZmLea14A* + cmyc + 35S terminator]

Ghi chú môi sử dụng trong nghiên cứu này:

- 1: 35Spromoter F: môi trên vùng promoter 35S
- 2: *ZmLea14A* NcoI F: môi trên gen đích *ZmLea14A* chứa điểm cắt của RE NcoI
- 3: cMyc KDEL R: môi trên vùng gen đích chứa đuôi peptide cMyc

2.2. Phương pháp

DNA tổng số từ lá ngô được tách sử dụng hóa chất CTAB theo phương pháp của Doyle và Doyle năm 1990 [9]. RNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá ngô sử dụng TRI Reagent (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu RNA tinh sạch được sử dụng cho phản ứng tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của bộ kit First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real - Time PCR (hãng Affymetrix). Thể tích phản ứng PCR 25 μ L bao gồm 1 μ L của 20 mM DNA/cDNA tổng số; 1 μ L của 10 μ M mỗi mỗi; 12,5 μ L DreamTaq master mix (2X); 10,5 μ L H₂O. Chu trình phản ứng trên máy PCR như sau: 95°C - 3 phút; 30 chu kỳ: 95°C - 45 giây, 58°C - 45 giây, 72°C - 1 phút; 72°C - 5 phút; 4°C. Các cặp mồi sử dụng cho PCR được mô tả ở hình 1, cặp 35Spromoter F và cMycKDEL R nhân đoạn có kích thước 659 bp và cặp mồi ZmLea14A NcoI F và cMycKDEL R nhân đoạn có kích thước 537 bp.

Lai Southern được tiến hành như sau: Khoảng 5 μ g DNA tổng số được xử lý với enzyme giới hạn HindIII. Sản phẩm cắt giới hạn được điện di trên gel agrose 1% ở hiệu điện thế 50V trong vòng 3 giờ. Bản gel sau đó được xử lý và chuyển lên màng thấm theo quy trình của hãng Amersham. DNA được cố định trên màng bằng tia UV. Đầu dò được tổng hợp dựa trên trình tự vùng từ giữa gen *ZmLEA14A* đến 35S-terminator kích thước 588bp. Các bước đánh dấu đầu dò, lai DNA, rửa, hiện màu được thực hiện theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất trong bộ kit DIG high prime DNA Labeling and Detection Starter kit I (Roche). Tín hiệu hiện màu trên màng được ghi lại bằng máy chụp hình. Hình ảnh màng sau hiện màu được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

Việc tách chiết protein tổng số sử dụng 100 μ L đệm chiết 1X SDS - PAGE và nghiền mẫu lá thành dịch đồng thể sau đó biến tính dịch chiết ở 95°C trong 10 phút. Ly tâm 13000v/p trong 15 phút và thu dịch trong. Sau khi chạy điện di protein tổng số trên gel SDS-PAGE, tiến hành chuyển protein từ gel sang màng nitrocellulose bằng bộ chuyên màng (Bio-Rad) ở 100V, 150 mA trong 1 giờ. Block màng trong 20 ml Blocking buffer. Rửa màng với 20 ml TBST 3 lần. Ủ màng kháng thể kháng cMyc đã được hòa loãng với tỉ lệ thích hợp trong 10 ml Dilution buffer trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng với 20 ml TBST 3 lần. Ủ màng với kháng thể thứ cấp gắn alkaline phosphatase được hòa loãng 1:10.000 trong 10 mL Dilution buffer trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục rửa màng với 20 ml TBS trong 5 phút. Lắc đều dung dịch 1-step NBT/BCIP và bổ sung 10 ml lên màng. Ủ trong 5 - 15 phút đến khi hiện màu. Rửa màng với nước trong 10 phút, làm khô màng bằng giấy thấm. Kiểm tra sự biểu hiện bằng protein hiển thị trực tiếp trên màng.

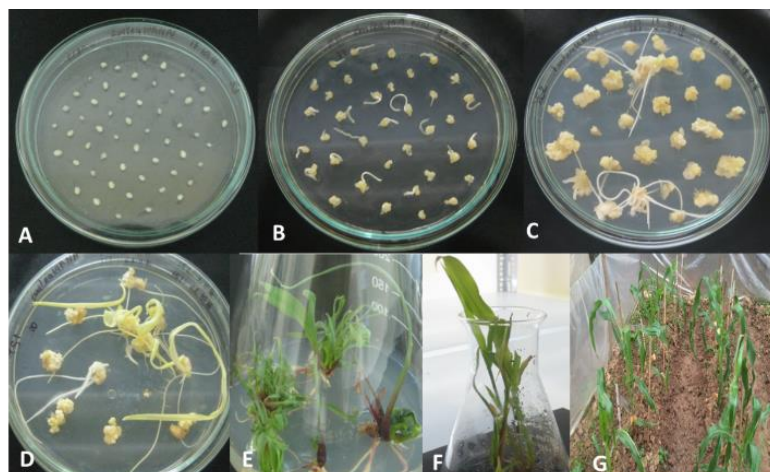
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá sự có mặt gen chuyển ở cây ngô T0 chuyển gen

Sau quá trình biến nạp, đã tái sinh và lựa chọn được 79 cây ngô T0 (Hình 2). Cây T0 sinh trưởng phát triển bình thường được lấy mẫu lá để tách DNA tổng số nhằm đánh giá sự có mặt của gen *ZmLEA14A* bằng PCR với cặp mồi 35Spromoter F-cMycKDEL R (kích thước sản phẩm nhân lên: 659 bp), cặp mồi là đặc hiệu với đoạn gen đích trong cấu trúc 35S-*ZmLEA14A*. Trong ba cây T0 dương tính với gen đích là L2 (đường chạy 29 hình 3), L3 (đường chạy 39 hình 3) và L4 (đường chạy 96 hình 3), chỉ cây L3 với kiểu hình bình thường, có còi, bắp tự thụ cho hạt T1, do vậy các cây T1 thuộc dòng này được tiếp tục đánh giá.

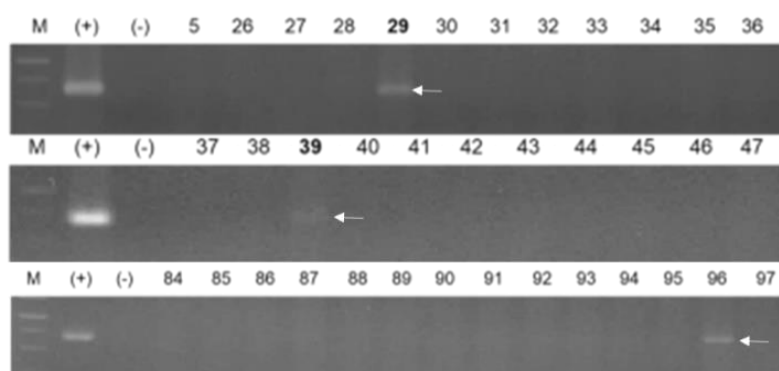
3.2. Đánh giá sự duy trì ổn định của gen chuyển ở cây ngô T1

Cây ngô T0 chuyển gen thường gặp khó khăn trong việc tự thụ phần để có hạt, tuy nhiên cây L3 đã tự thụ và thu được 17 hạt, toàn bộ 17 cây T1 từ dòng này được sàng lọc bằng cách nhân gen đích với cặp mồi 35S promoterF - cMycKDELR (kích thước sản phẩm nhân lên: 659 bp) trong phản ứng PCR. Kết quả có 12 cây dương tính (Hình 4).



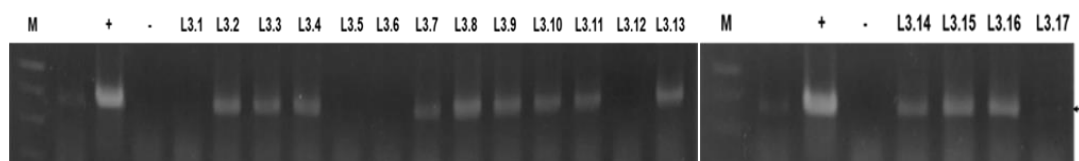
Hình 2. Chuyển gen *ZmLEA14A* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*.

(A): Phôi ngô sau lây nhiễm đặt trên môi trường đồng nuôi cây. Hình (B): Phôi ngô phát triển trên môi trường phục hồi. Hình (C): Mô sẹo hình thành trên môi trường chọn lọc. Hình (D): Các chồi phát sinh từ mô sẹo trên môi trường tái sinh. Hình (E): Thân và lá tái sinh. Hình (F): Tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Hình (G): Cây chuyển gen trồng trong nhà lưới.



Hình 3. PCR nhân gen đích *ZmLEA14A* ở cây T0

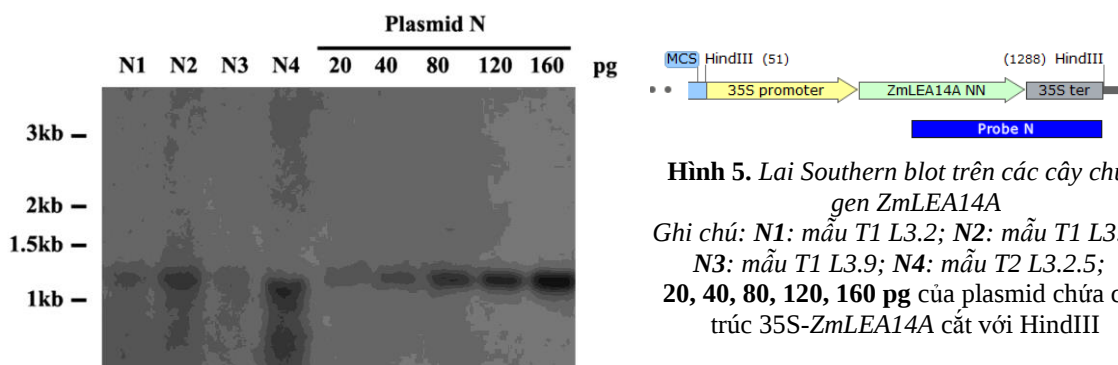
Ghi chú: **M**: thang chuẩn DNA 1 kb; +: đối chứng dương với khuôn là plasmid pCAM/35S-*ZmLEA14A*; -: đối chứng blank (nước); các giếng còn lại: sản phẩm PCR từ DNA của cây ngô chuyển gen



Hình 4. PCR nhân gen *ZmLEA14A* ở cây T1

Ghi chú: **M**: thang chuẩn DNA 1 kb; +: đối chứng dương với khuôn là plasmid pCAM/35S-*ZmLEA14A*; -: đối chứng blank (nước); các giếng còn lại: sản phẩm PCR từ DNA của cây ngô chuyển gen

Kỹ thuật lai Southern được tiến hành để khẳng định thêm về sự duy trì của gen trong cây. Với lượng 5 μ g DNA tổng số tinh sạch từ 3 mẫu T1 (L3.2, L3.8, L3.9) và 1 mẫu T2 (L3.2.5), DNA tổng số được cắt với enzyme *Hind*III, enzyme cắt ở 2 đầu của cấu trúc biểu hiện cho kích thước đoạn là 1240 bp, probe N dài 588 bp là đoạn nằm trong vùng từ giữa gen *ZmLEA14A* đến 35S-terminator (Hình 5). Kết quả lai cho thấy có sự hiện diện của gen chuyển trên các cây chuyển gen T1 và T2 (Hình 5 giếng N1 đến N4).

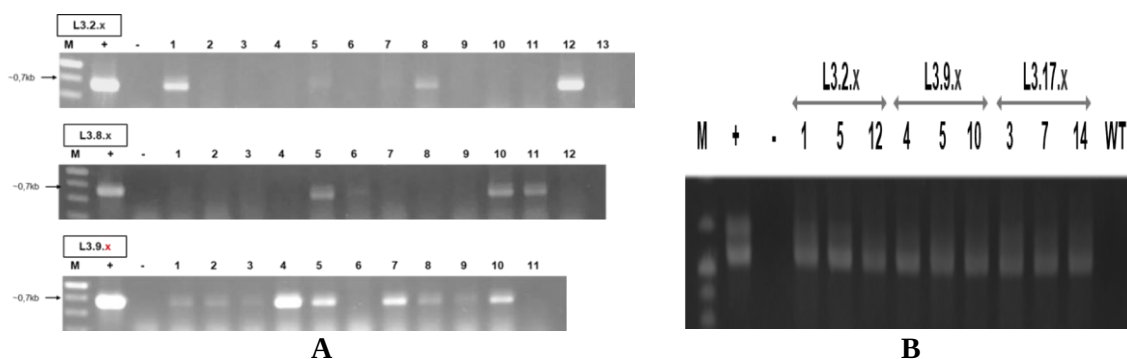


Hình 5. Lai Southern blot trên các cây chuyển gen *ZmLEA14A*

Ghi chú: N1: mẫu T1 L3.2; N2: mẫu T1 L3.8;
N3: mẫu T1 L3.9; N4: mẫu T2 L3.2.5;
20, 40, 80, 120, 160 pg của plasmid chứa cấu trúc 35S-*ZmLEA14A* cắt với HindIII

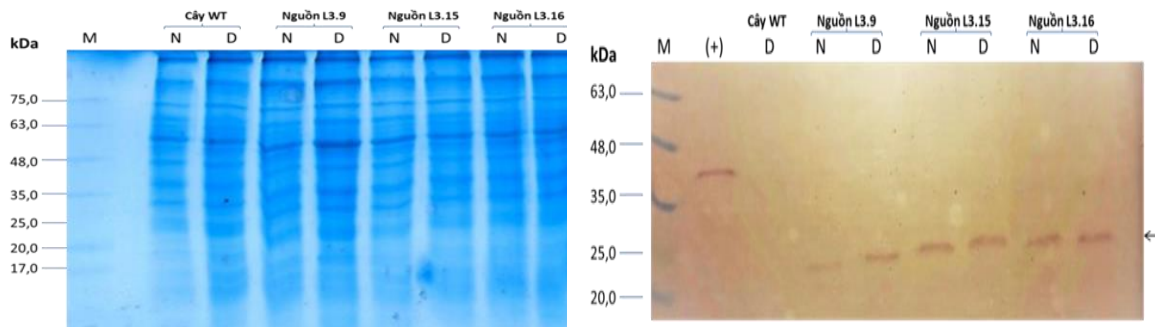
3.3. Đánh giá sự duy trì và biểu hiện gen *ZmLEA14A* ở cây ngô T2 chuyển gen

Các cây T2 cũng được sàng lọc bằng PCR với gen đích cho thấy vẫn duy trì gen chuyển ở một số dòng này như L3.2, L3.8, L3.9 Hình 6A và những dòng khác (kết quả không trình bày). Tiếp tục đánh giá sự biểu hiện của gen *ZmLEA14A* ở mức độ phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR đối với cây chuyển gen thế hệ T2 bao gồm 9 cây: L3.2.1, L3.2.5, L3.2.12 (nguồn T1 L3.2); L3.9.4, L3.9.5, L3.9.10 (nguồn T1 L3.9) và L3.17.3, L3.17.7, L3.17.14 (nguồn T1 L3.17). Sử dụng cặp mồi khuếch đại đoạn trình tự mã hóa của gen đích là *ZmLEA14ANcoIF* – *cMycKDEL R* có kích thước là 537 bp, cặp mồi hoàn toàn đặc hiệu với đoạn gen đích trong cấu trúc 35S-*ZmLEA14A* (Hình 6B). Các kết quả này thể hiện gen *ZmLEA14A* đã được phiên mã trên các cây T2 này.



Hình 6. Kiểm tra duy trì gen *ZmLEA14A* bằng PCR (A) và sự phiên mã của gen *ZmLEA14A* bằng RT-PCR ở cây T2 (B)

Một số cây thế hệ T2 PCR dương tính với gen đích từ nguồn T1 L3.9, L3.15 và L3.16 cùng với cây không chuyển gen WT được cho nảy mầm hạt. Khi cây ngô đạt 3 lá được xử lý hạn trong phòng thí nghiệm. Sau 2 ngày, cây wildtype và cây chuyển gen *ZmLEA14A* đều có dấu hiệu mất nước. Mẫu lá được thu để tách protein và tiến hành lai Western Blot với kháng thể kháng cMyc, vì đoạn gen *ZmLEA14A* trong cấu trúc được thiết kế có gắn peptide cMyc, để kiểm tra sự biểu hiện của gen *ZmLEA14A* trong cây chuyển gen ở mức độ protein. Kết quả lai Western thể hiện, gen *ZmLEA14A* được chuyển vào trong cây ngô đã được dịch mã thành protein trong cả hai điều kiện bình thường và hạn (Hình 7). Điều này hoàn toàn phù hợp với cấu trúc đã thiết kế là gen được điều khiển bằng promoter cơ định 35S. Như vậy, cây ngô T2 chuyển gen đã có sự biểu hiện của gen *ZmLEA14A* ở mức protein.



Hình 7. Kết quả lai Western Blot đánh giá sự biểu hiện của protein ZmLEA14A trong cây chuyển gen
M: Marker protein, (+): protein chuẩn khác có trình tự peptide cMyc được biểu hiện trong vi khuẩn,
N: cây ở điều kiện bình thường; D: cây ở điều kiện hạn

Như vậy, việc chuyển gen *ZmLEA14A* vào dòng ngô nền K7 đã thực sự ổn định nên đã duy trì và biểu hiện gen chuyển đến thế hệ T2. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu chuyển gen thuộc họ Lea nhằm tăng cường tính chống chịu cho cây trồng như *CaLEA6* của ớt [10], *AtLEA14A* của *Arabidopsis* [11], *IbLEA14A* ở khoai lang [12], *SiLEA14A* của kê đuôi cáo [13]. Trong các nghiên cứu về chức năng của nhóm protein này, việc tăng mức biểu hiện của protein *CaLEA6* phân lập từ ớt có thể cải thiện mức độ chịu hạn và mặn của cây thuốc lá chuyển gen. Bên cạnh đó, tăng mức độ biểu hiện của một số gen LEA nhóm 5 khác như *IbLEA14A* và *SiLEA14A* cũng đã cải thiện mức độ lignin hóa, tăng hàm lượng proline và đường hòa tan trong mô sẹo khoai lang (*Ipomoea batatas*), cây *Arabidopsis* và kê đuôi cáo (*Setaria italica*) được chuyển các gen này. Ở Việt Nam, việc chuyển một số gen chống chịu vào ngô đã được tiến hành như gen *modiCSpB* [14], *mtLD* [15], cùng với việc chuyển gen *ZmLEA14A* trong nghiên cứu này đã đóng góp thêm cho những nghiên cứu nhằm tạo cây ngô chuyển gen. Những kết quả này thực sự có ý nghĩa trong nghiên cứu ứng dụng để lai tạo cây ngô chịu hạn ở Việt Nam.

4. Kết luận

Cây ngô chuyển gen *ZmLEA14A* trên dòng nền K7, gen trong cấu trúc 35S-*ZmLEA14A* đã duy trì ổn định gen chuyển từ thế hệ T0 đến T2, sự biểu hiện gen được chứng minh qua RT-PCR và lai Western cho thấy gen biểu hiện ở cả mức phiên mã và dịch mã. Các cây chuyển gen *ZmLEA14A* sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo dòng ngô chịu hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. Grelet, A. Benamar, E. Teyssier, and M. H. Avelange-Macherel, "Identification in pea seed mitochondria of late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying," *Plant Physiology*, vol. 137, pp. 157-167, 2005.
- [2] K. Goyal, L. J. Walton, and A. Tunnacliffe, "LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress," *Biochemical Journal*, vol. 388, pp. 151-157, 2005.
- [3] J. Ingram and D. Bartels, "The molecular basis of dehydration tolerance in plants," *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 47, pp. 377-403, 1996.
- [4] B. Xiao, Y. Huang, N. Tang, and L. Xiong, "Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions," *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 115, no. 1, pp. 35-46, 2007.
- [5] X. Li and J. Cao, "Late embryogenesis abundant (LEA) gene family in maize: identification, evolution, and expression profile," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 34, no. 1, pp. 15-28, 2016.
- [6] M. M. Bui, T. L. Nguyen, H. H. Ha, T. T. H. Le, X. T. Nguyen, V. H. Nong, and T. T. H. Huynh, "A LEA gene from a Vietnamese maize landrace can enhance the drought tolerance of transgenic plants," *Agronomy*, vol. 9, no. 2, p. 62, 2019, doi:10.3390/agronomy 902006.
- [7] H. H. Ha, T. T. H. Le, and T. T. H. Huynh, "Transient expression of gene encoding *ZmLEA14A* protein in plant *Nicotiana benthamiana*," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 17, no. 3, pp. 491-497, 2019.

-
- [8] 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 Reports*, vol. 25, pp. 1024-1034, 2006.
- [9] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, pp. 13-15, 1990.
- [10] H. S. Kim, J. H. Lee, J. J. Kim, C. H. Kim, S. S. Jun, and Y. N. Hong, "Molecular and functional characterization of *CaLEA6*, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*," *Gene*, vol. 344, pp. 115-123, 2005.
- [11] M. Hundertmark and D. K. Hincha, "LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*," *BMC Genome*, vol. 9, pp. 118-139, 2008.
- [12] S. C. Park, Y. H. Kim, J. C. Jeong, C. Y. Kim, H. S. Lee, J. W. Bang, and S. S. Kwak, "Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (*IbLEA14*) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli," *Planta*, vol. 233, pp. 621-634, 2011.
- [13] M. Wang, P. Li, C. Li, Y. Pan, X. Jiang, D. Zhu, Q. Zhao, and J. Yu, "*SiLEA14*, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet," *BMC Plant Biol*, vol. 14, pp. 290-305, 2014.
- [14] 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 transformation the gene into maize plant," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 125-132, 2014.
- [15] 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*) gene," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 60, no. 9, pp. 59-64, 2018.