

TRANSFORMATION AND ASSESSMENT OF *Melia azedarach* L. LINES CARRYING GA20-OXIDASE GENE PROMOTING BY *GmPrP2* PROMOTER

Ong Xuan Phong^{1,3}, Ly Khanh Linh², La Viet Hong³, Do Tien Phat², Pham Bich Ngoc^{2*}

¹Graduate University of Sciences and Technology - VAST

²Institute of Biotechnology – VAST, ³Hanoi Pedagogical University 2

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 11/8/2022	<i>Melia azedarach</i> L. is a forest tree with many uses, in Vietnam it is grown quite popularly. In this study, GA20 encoding for the enzyme GA20-oxidase which plays an important role in GA biosynthesis in plant cells was transferred to the plant by vector GmPrP2:GA20ox.. The results of checking the presence of the GA20ox gene by PCR showed that there were 15 lines carrying the gene. Transgene-carrying sinus lines were evaluated for expression at the molecular level by RT-PCR and also showed that the GA20ox gene was active. Assessing the growth of transgenic lines after 8 weeks of age, lines T16, T20 and T22 had an increase in height and number of nodes by 150 - 200% compared to the control. Anatomy of the 8th stem showed that the density of xylem fibers and the number of cells on the xylem fibers of the transgenic lines were higher than that of the control lines, and the cell wall thickness of the lines were similar. These results demonstrate the role of the GmPrP2 promoter with the GA20ox gene on growth and biomass improvement in woody plants.
Revised: 14/9/2022	
Published: 15/9/2022	
KEYWORDS	
Assessment	
<i>Melia azedarach</i> L.	
GA20 oxidase	
Promoter	
Transgenic	

BIẾN NẠP VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG XOAN TA (*Melia azedarach* L.) MANG GEN GA20-OXIDASE ĐƯỢC ĐIỀU KHIỂN BỞI PROMOTER *GmPrP2*

Ong Xuân Phong^{1,3}, Lý Khánh Linh², La Việt Hồng³, Đỗ Tiến Phát², Phạm Bích Ngọc^{2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 11/8/2022	Cây xoan ta là một cây lâm nghiệp có nhiều công dụng, ở Việt Nam cây xoan được trồng khá phổ biến. Trong nghiên cứu này cấu trúc mang gen GA20ox mã hoá cho enzyme GA20-oxidase đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp GA ở tế bào thực vật đã được chuyển vào cây xoan ta bằng vector GmPrP2:GA20ox. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen GA20ox bằng kỹ thuật PCR có 15 dòng mang gen. Các dòng xoan mang gen chuyển được đánh giá mức độ biểu hiện ở cấp độ phân tử bằng kỹ thuật RT-PCR cho kết quả gen GA20ox đã hoạt động. Đánh giá sinh trưởng các dòng mang gen chuyển sau 8 tuần tuổi thì dòng T16, T20 và T22 có chiều cao và số đốt tăng 150 - 200% so với đối chứng. Giải phẫu đốt thân thứ 8 cho thấy mật độ sợi xylem và số tế bào trên sợi xylem của các dòng mang gen chuyển đều cao hơn dòng đối chứng, còn độ dày thành tế bào các dòng tương tự nhau. Những kết quả này bước đầu chứng minh vai trò của promoter GmPrP2 với gen GA20ox đối với quá trình tăng trưởng và cải thiện sinh khối ở cây thân gỗ.
Ngày hoàn thiện: 14/9/2022	
Ngày đăng: 15/9/2022	
TỪ KHÓA	
Đánh giá	
Chuyển gen	
GA20 oxidase	
Promoter	
Xoan ta	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6356>

* Corresponding author. Email: pbngoc77@gmail.com

1. Giới thiệu

Cây xoan ta (*Melia azedarach* L.) thuộc họ Xoan (Meliaceae), thuộc nhóm cây gỗ nhỏ, đôi khi là cây gỗ lớn, có chiều cao 15 - 20m, phân bố ở các nước Đông Á [1]. Cây xoan ta là loài có nhiều tác dụng như làm thuốc trừ sâu sinh học, phân bón và lấy gỗ [2], [3]... Ở Việt Nam, cây xoan là loài cây bản địa được trồng rộng khắp từ Bắc đến Nam, là loài cây có sức chống chịu tốt, thích hợp sinh trưởng, phát triển trên nhiều địa hình khác nhau và mang lại giá trị kinh tế.

Hiện nay, một số kết quả nghiên cứu tạo giống các cây lâm nghiệp sinh trưởng nhanh bằng kỹ thuật chuyển gen để tăng khả năng sinh tổng hợp chất điều tiết sinh trưởng gibberellin acid (GA) đã thu được một số kết quả khả quan [4], [5]. GA là hợp chất dạng diterpenes tham gia vào quá trình sinh trưởng và phát triển của cây do tác động đến quá trình phân chia tế bào như: nảy mầm, ra hoa, kéo dài thân... Gen mã hóa cho các enzyme tham gia sinh tổng hợp GA nội sinh có rất nhiều dạng khác nhau, enzyme GA20-oxidase được mã hóa bởi *GA20* tham gia quá trình sinh tổng hợp GA trong tế bào thực vật. Các nhà khoa học đã nghiên cứu và công bố một số công trình chuyển gen mã hóa cho GA20-oxidase thu được kết quả chứng minh cho vai trò tăng chiều cao thân và tăng sinh khối ở cây *Arabidopsis* [6], ở cây dương chuyển gen *GA20ox* được điều khiển bởi promoter 35S, gỗ phát triển đặc biệt thể hiện ở khối lượng khô của thân tăng gấp bốn lần so với đối chứng [7]. Trong khi đó, sự biểu hiện quá mức gen mã hóa enzyme Gibberellin 2-oxidase (*GA2ox*) lại dẫn đến kiểu hình lùn, cơ quan sinh dưỡng nhỏ ở cây *Arabidopsis* và *Jatropha* [8]. Việc tìm kiếm gen mã hóa liên quan đến con đường sinh tổng hợp GA và promoter điều khiển phù hợp là điều kiện cần thiết. Trong nghiên cứu này, promoter *GmPrP2* đặc hiệu ở rễ được thiết kế để điều khiển hoạt động gen *GA20*, cấu trúc được chuyển vào cây xoan ta nhằm tạo ra các dòng chuyển gen có sự phát triển gỗ tốt, cây phát triển cân đối.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

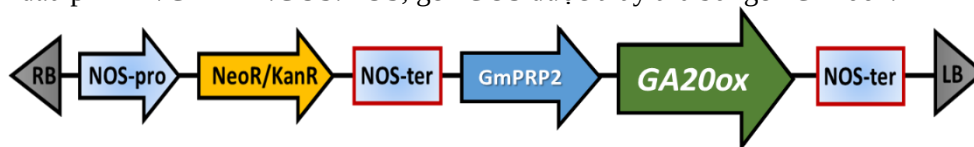
2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống xoan ta dùng để làm vật liệu chuyển gen, gen *GA20ox*, Vector biểu hiện gen pBI121, chủng *E. coli* DH5 α , chủng *Agrobacterium tumefaciens* Cv58 dùng trong chuyển gen. Các hóa chất liên quan tới thí nghiệm do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế vector

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế cấu trúc vector *GmPrP2:GA20ox* dựa trên vector pBI₁₂₁. Promoter *GmPrP2* trong cấu trúc được phân lập từ cây đậu tương (Hình 1). Từ vector nền ban đầu pBI121/*GmPrP2*:*GUS*:*NOS*, gen *GUS* được thay thế bởi gen *GA20ox*.



Hình 1. Sơ đồ cassette biểu hiện *GmPrP2:GA20ox*

2.2.2. Phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Cấu trúc mang gen *GA20ox* đã thiết kế được chuyển vào mô cây xoan ta thông qua *Agrobacterium* theo phương pháp của Bùi Văn Thắng [9]. Đoạn thân mầm và lá mầm tiên nuôi cấy 24 giờ trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA để làm vật liệu chuyển gen. Đoạn thân mầm được lây nhiễm trong dung dịch *Agrobacterium* đã chuẩn bị ở trên trong 30 phút (lắc nhẹ). Sau đó, mẫu được thấm khô và cấy chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy MS bổ sung 200 μ M Acetosyringone, 1,0 mg/l BAP và 0,1 mg/l NAA, nuôi trong buồng tối, ở nhiệt độ

28°C trong 48 giờ. Đồng thời cũng tiến hành cấy 50 mẫu đối chứng không lây nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trên môi trường đồng nuôi cấy. Sau 48 giờ đồng nuôi cấy, các mẫu xoan được rửa qua nước cất vô trùng 2 lần, sau đó chuyển sang rửa bằng nước cất vô trùng có bổ sung Cefotaxime 500 mg/l trong 10 phút. Đặt mẫu lên giấy thấm vô trùng, thấm khô và cấy chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh chọn lọc.

2.2.3. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR

Các dòng xoan ta sau khoảng 4 tuần sinh trưởng ngoài nhà lưới, sử dụng phương pháp PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển với cặp mồi đặc hiệu GA20ox-F (5'-CCCGGGATGGCCGT AAGTTTCGTAACAA-3') và GA20ox-R (5'-GAGCTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGA-3') theo chu trình nhiệt 94°C/4 phút; 30 chu kỳ [94°C/40 giây; 56°C/40 giây; 72°C/1 phút] 72°C/7 phút; giữ ở 4°C để bảo quản. Sử dụng gel agarose 0,8% để điện di kiểm tra sản phẩm của phản ứng PCR. Nhuộm bằng dung dịch ethidium bromine, sau đó quan sát dưới đèn UV.

2.2.4. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển ở mức phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR

RNA tổng số tách từ rễ của dòng xoan ta chuyển gen được dùng để tổng hợp cDNA và thực hiện phản ứng RT-PCR với các cặp mồi đặc hiệu GA20ox-Frt (5'-GGCGATACTTTCATGGC TCT-3'), GA20ox-Rrt (5'-GAGCTCTCACAGATCCTCTTCT-3'), GADPH-F (5'-GGCTGTG GGAAAGGTCTTGCC-3') và GADPH-R (5'-CTAGCTTCCTTCGCCAGCCTC-3').

2.2.5. Đánh giá sinh trưởng của cây xoan chuyển gen

Cây xoan ta chuyển gen được trồng trong nhà lưới, theo dõi và đo chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao (cm), đếm số đốt/cây sau 8 tuần.

2.2.6. Phân tích giải phẫu

Đốt thân thứ 8 của các cây xoan 2 tháng tuổi được dùng để giải phẫu và phân tích. Lát cắt ngang của thân được nhuộm với 0,05% toluidine blue O (trên) và 2% phloroglucinol/HCl (dưới) ở độ phóng đại 10x (a), thanh ngang tương đương với 5000 μ m và độ phóng đại 100x (b), thanh ngang tương đương với 500 μ m.

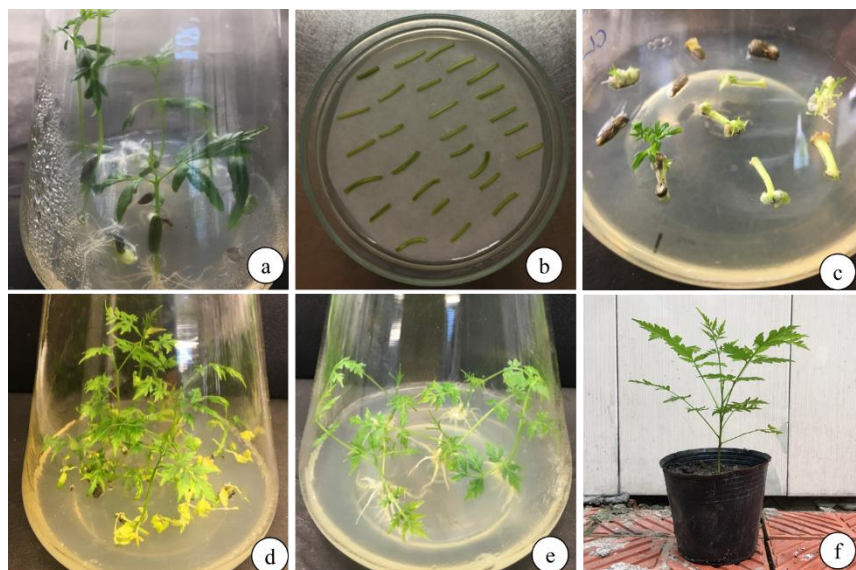
2.2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Sử dụng chương trình Excel 2016 để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (σ) cho dữ liệu định lượng. Dùng phương pháp giới hạn sai khác nhỏ nhất $LSD_{0,05}$ đánh giá sự sai khác các giá trị trung bình [10]. Các chỉ tiêu như chiều cao cây, số đốt, độ dày thành tế bào, số lượng tế bào trên một sợi xylem, độ rộng vùng xylem đã được phân tích thống kê trong nghiên cứu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo dòng xoan ta chuyển gen

Trong nghiên cứu này, cấu trúc mang gen chuyển GA20ox được điều khiển bởi promoter GmPrP2 đã được đưa vào mẫu mô cây xoan ta thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens*. Các giai đoạn của quá trình chuyển gen được thể hiện tóm lược ở Hình 2. Từ 750 mẫu ban đầu, sau đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A.tumefaciens* mang vector đích, có 331 mẫu cảm ứng tái sinh (tương ứng 44,1%), thu được 213 chồi tái sinh và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, 35 dòng sống sót và sinh trưởng trên môi trường chọn lọc, tỷ lệ tạo dòng mang gen GA20ox là 4,67%, hiệu suất cụ thể của từng lô thí nghiệm thể hiện chi tiết tại Bảng 1. Hiệu suất chuyển gen này thấp hơn so với công bố trước đây của tác giả trên cây xoan ta [9], có thể do sự khác biệt trong cấu trúc cassette chuyển gen.



Hình 2. Hình ảnh các giai đoạn của quá trình tạo dòng xoan mang gen chuyển GA20ox
(a). Vật liệu để chuyển gen; (b). Đồng nuôi cấy thân mầm với vi khuẩn *A. tumefaciens*, (c). Tái sinh chồi;
(d), (e). Chọn lọc chồi; (f). Cây xoan ta mang gen chuyển sinh trưởng môi trường tự nhiên

Bảng 1. Thống kê kết quả và tỉ lệ tạo dòng xoan mang gen chuyển GA20ox

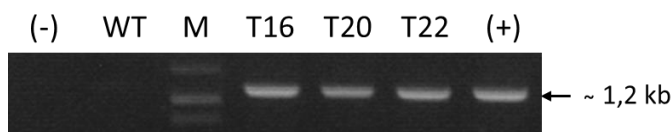
Cấu trúc chuyển	Lô thí nghiệm	Số mẫu	Số mẫu cảm ứng tạo chồi		Chọn lọc chồi	
			Số lượng	Số chồi tách	Số chồi sống sót và ra rễ	
GmPrP2:: GA20ox	1	250	97	58	9	
	2	250	118	72	11	
	3	250	116	83	15	
	Tổng số	750	331	213	35	
Đối chứng	1*	50	39	26	1	
	2*	50	43	32	32	
	Tổng số	100	82	58	33	

Chú thích: 1* và 2* các chồi được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và không chứa kháng sinh

GA20ox đã được nghiên cứu biểu hiện trên cây xoan ta dưới sự điều khiển của promoter 35S, cho thấy các dòng chuyển gen sinh trưởng mạnh mẽ hơn so với các dòng xoan ta không chuyển gen [4]. Sự biểu hiện StGA20ox1 ở cây khoai tây dưới sự điều khiển của promoter 35S hoặc promoter đặc hiệu ở lá STLS1 cho thấy mức độ biểu hiện mRNA cao hơn so với dòng đối chứng, đều thể hiện sự sinh trưởng kéo dài đặc trưng giống như cây được xử lý bằng GA ngoại sinh [11]. Ở cây đậu Hà Lan, GA được chứng minh là di chuyển từ rễ đến thân và từ thân trở lại rễ [12]. Do đó, sự biểu hiện đặc hiệu của GA20ox đặc hiệu ở rễ cây xoan ta được dự đoán sẽ tạo ra các dòng xoan ta sinh trưởng, phát triển tốt.

3.2. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển GA20ox

PCR là kỹ thuật được sử dụng phổ biến trong sàng lọc cây chuyển gen vì nó có tính chính xác cao, đơn giản và rút ngắn thời gian [13]. DNA tổng số thu từ lá xoan ta trồng trong nhà lưới được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả phản ứng PCR, mẫu nào xuất hiện băng DNA có kích thước ~1,2 kp thì sẽ mang gen chuyển. Sau khi tiến hành phản ứng PCR với các dòng xoan ta, kết quả điện di kiểm tra sản phẩm được thể hiện trên Hình 3.

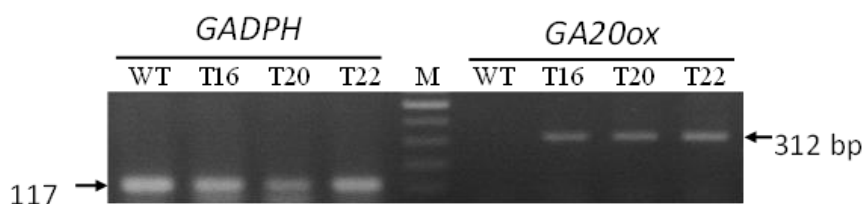


Hình 3. Hình ảnh điện di kiểm tra dòng xoan ta trên gel agarose 0,8% (w/v). T16, 20, 22: các dòng xoan ta chuyển cấu trúc *GmPrP2::GA20ox*; (B): (+), (-). Đối chứng dương và đối chứng âm; (M). Thang DNA chuẩn

Kết quả sàng lọc bằng phân tích phân tử cho thấy trong 35 dòng xoan ta có 15 dòng mang gen chuyển *GA20ox*. Các dòng xoan ta này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển ở mức mRNA

Rễ của 03 trong số 15 dòng xoan ta mang cấu trúc *GmPrP2:GA20ox* được dùng để kiểm tra sự biểu hiện ở mức phiên mã nhằm đánh giá bước đầu hoạt động của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen. Kết quả phản ứng RT-PCR ở rễ được thể hiện trên Hình 4.

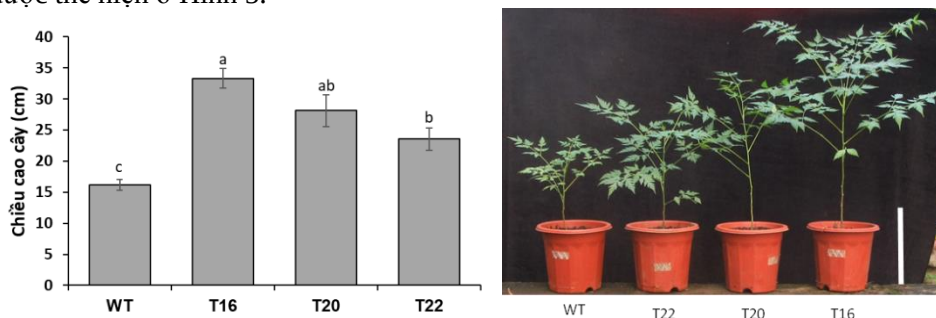


Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của gen chuyển *GA20ox* trong các dòng xoan ta *GmPrP2:GA20ox*. (M). Thang DNA chuẩn 1 kb.

Gen *GA20ox* có kích thước ~1,2 kp, vùng mã hóa có kích thước khoảng 0,3 kb, kết quả thí nghiệm kiểm tra mức độ hoạt động của cấu trúc mang gen chuyển thể hiện trên hình 4 cho thấy, các dòng xoan ta T16, T20, T22 đều cho hình ảnh với băng điện di có kích thước đúng như dự đoán. Kết quả này chứng minh cấu trúc mang gen chuyển *GA20ox* được điều khiển bởi promoter *GmPrP2* sau khi đưa vào cây đã hoạt động và biểu hiện sản phẩm.

3.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các dòng xoan ta mang gen *GA20ox*

Tác dụng sinh lý của gibberellin là tác động lớn tới sự sinh trưởng theo chiều dài của thân, sự kéo dài của lóng. Gibberellin tác động mạnh theo chiều dọc lên pha giãn của tế bào, vì vậy chúng tôi đánh giá quá trình sinh trưởng về chiều cao và số đốt các dòng xoan ta mang gen *GA20ox*. Dòng xoan ta chuyển gen được trồng trong nhà lưới với điều kiện chăm sóc và chế độ dinh dưỡng phù hợp. Sau 8 tuần, tiến hành đo chiều cao của các dòng cây chuyển gen. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 5.

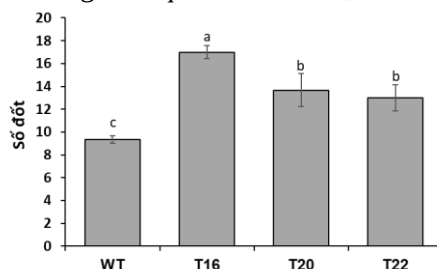


Hình 5. Biểu đồ chiều cao cây và ảnh đại diện các dòng chuyển gen

(Ghi chú: Giá trị thể hiện là giá trị trung bình của 3 lần nhắc lại.

Kí tự a, b, c giữa các cột số liệu thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$)

Kết quả thể hiện trên biểu đồ cho thấy, các dòng cây chuyển gen đều có sự phát triển về chiều cao tốt hơn so với cây đối chứng. Dòng T16 có chiều cao đạt gấp đôi (33,3 cm) so với dòng WT (16,2 cm), dòng cây chuyển gen có chiều cao thấp hơn các dòng còn lại T22 (23,55 cm) cũng đạt hơn 1,5 lần so với đối chứng. Số đốt được đếm tại thời điểm 8 tuần cho kết quả các dòng chuyển gen có số đốt lớn hơn dòng đối chứng. Kết quả theo dõi được thể hiện trên biểu đồ Hình 6.



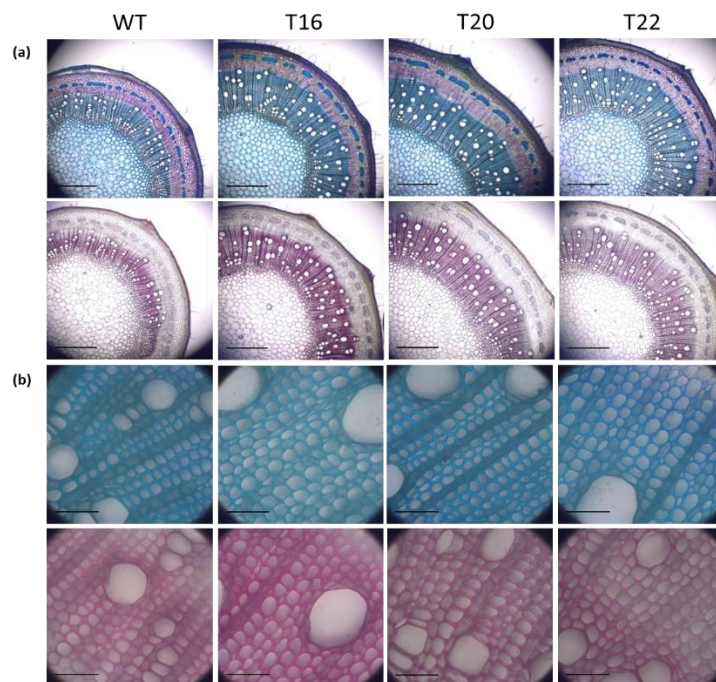
Hình 6. Biểu đồ số đốt trên cây

(Ghi chú: Kí tự a, b, c giữa các cột số liệu thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$)

Dòng T16 có số đốt trung bình là 17, gấp gần 2 lần số đốt của dòng đối chứng (trung bình 9,3), còn dòng T20 và T22 có số đốt trung bình lần lượt là 13,67 và 13 gấp 1,5 với đối chứng. Qua kết quả quan sát số liệu về chiều cao và số đốt cho thấy việc sử dụng promoter GmPrP2 mang gen GA20ox để chuyển vào cây xoan ta giúp cho cây phát triển cân đối không gặp hiện tượng biểu hiện quá mức của GA20ox sử dụng promoter 35S như các nghiên cứu trước đó [6].

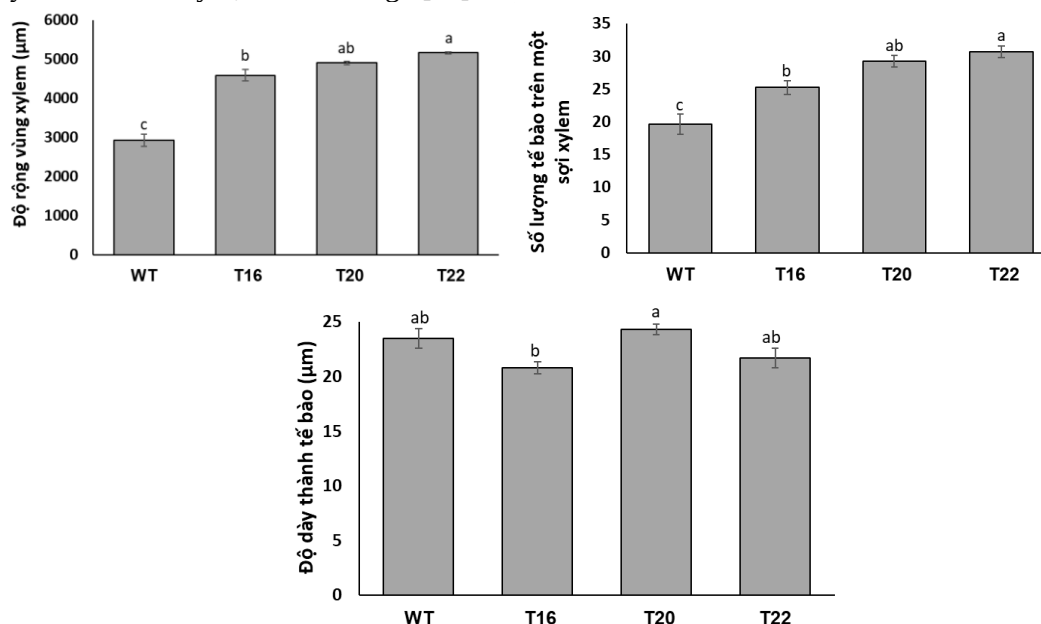
3.5. Đánh giá khả năng phát triển của xylem trên các dòng xoan ta mang gen GA20ox

Theo Park và cộng sự (2015), sự biểu hiện của gen mã hóa GA20ox bởi promoter 35S ở cây dương sẽ thúc đẩy sự hình thành gỗ (xylem) cũng như sự kéo dài của tế bào thực vật [7]. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá sự phát triển của xylem ở các dòng xoan ta mang gen mã hóa GA20ox bởi promoter GmPrP2 đặc hiệu ở rễ bằng cách giải phẫu đốt thân của cây 8 tuần tuổi. Kết quả thí nghiệm thể hiện trên Hình 7.



Hình 7. Lát cắt ngang của đốt thân thứ 8: a), thanh ngang tương đương với 5000 μm và độ phóng đại 100x (b), thanh scale bar tương đương với 500 μm .

Kết quả thống kê về độ rộng vùng xylem, số lượng tế bào trên sợi xylem và độ dày thành tế bào trong nghiên cứu này phù hợp với công bố trước đây khi biểu hiện gen mã hóa *GA20ox* ở cây dương dưới sự điều khiển của promoter 35S [7]. Kết quả này có thể do GA được sinh tổng hợp ở xylem đang mở rộng, trong khi tiền chất tổng hợp GA phloem, sau đó mới được vận chuyển đến xylem để thúc đẩy sự hình thành gỗ [14].



Hình 8. Biểu đồ thể hiện độ rộng vùng xylem, số lượng tế bào trên một sợi xylem và độ dày thành tế bào ở đốt thân thứ 8 (Kí tự a, b, c giữa các cột số liệu thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$)

Kết quả thí nghiệm thể hiện trên biểu đồ Hình 8 cho thấy độ rộng vùng xylem của các cây mang gen chuyển đều rộng hơn cây đối chứng. Độ rộng vùng xylem cao nhất quan sát thấy ở dòng T22, sau đó là dòng T20 và T16. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đó do sản phẩm của *GA20ox* tác động đến sự biệt hóa thứ cấp xylem làm cho các cây mang gen chuyển có vùng xylem lớn hơn [15].

Đối với chỉ tiêu số lượng tế bào trên một sợi xylem cũng cho kết quả tương tự cao nhất ở dòng T22, sau đó là dòng T20 và T16, tất cả các dòng thí nghiệm đều cho kết quả cao hơn so với đối chứng là cây WT. Nhìn vào mức độ thể hiện sự sai khác ta thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa các dòng chuyển gen với dòng đối chứng. Các dòng cây chuyển gen có chiều cao phát triển tốt hơn thì độ rộng vùng xylem và số lượng tế bào trên một sợi xylem thấp hơn (cụ thể thứ tự chiều cao là T16, T20, T22 còn thứ tự độ rộng vùng xylem và số lượng tế bào trên một sợi xylem là T22, T20, T16). Về chỉ tiêu độ dày thành tế bào thì không có sự khác biệt nhiều giữa các dòng xoan ta chuyển gen và dòng cây đối chứng, sự khác biệt giữa các dòng này đều không có ý nghĩa về mặt thống kê. Từ kết quả thí nghiệm thấy rằng, các dòng mang gen chuyển có hệ sợi xylem phát triển hơn dòng đối chứng cả về mật độ và số lượng tế bào trong một sợi và vẫn đảm bảo sự phát triển độ dày thành tế bào tương đương dòng đối chứng.

4. Kết luận

Cấu trúc *GmPrP2::GA20ox* được chuyển vào đoạn thân cây xoan ta 2 tuần tuổi thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Tỷ lệ tạo dòng chuyển gen trung bình đạt 4,67%. Bằng phân tích PCR với cặp mồi đặc hiệu, có 15 dòng cây chuyển gen trong số 35 dòng trên môi trường chọn lọc mang cấu trúc chứa gen chuyển *GmPrP2::GA20ox*. Gen chuyển dưới sự điều khiển của promoter *GmPrP2* đã được chứng minh hoạt động thông qua phân tích RT-PCR. Các dòng xoan mang gen chuyển được mang trồng trong nhà lưới và đánh giá sinh trưởng. Sau 8 tuần theo dõi, kết quả cho

thấy tất cả các dòng mang gen chuyển đều có chiều cao cây tốt hơn so với đối chứng. Đặc biệt, dòng T16 có chiều cao gấp đôi cây đối chứng; số đốt thân cũng tương ứng với kết quả chiều cao cây. Giải phẫu đốt thân thứ 8 sau 8 tuần tuổi để đánh giá sự phát triển của hệ sợi xylem trong tế bào thu được các dòng mang gen chuyển có số mật độ xylem trong tế bào và số lượng tế bào trong một sợi xylem đều cao hơn hẳn so với dòng đối chứng, trong khi đó độ dày thành tế bào giữa các dòng thí nghiệm và đối chứng như nhau, từ đó có thể kết luận các dòng mang gen chuyển sinh trưởng phát triển tốt hơn so với dòng đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. Pennington, *Flora Neotropica Vol28: Meliaceae*, ed: The New York Botanical Garden Press, 1981.
- [2] M. C. Carpinella, L. M. Giorda, C. G. Ferrayoli, and S. M. Palacios, "Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, pp. 2506-2511, 2003.
- [3] G. Schmidt, A. A. Ahmed, and M. Breuer, "Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (lep. noctuidae)," *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, vol. 70, pp. 4-12, 1997.
- [4] X. D. Do, V. T. Bui, V. G. Ho, V. S. Le, and H. H. Chu, "Transformation of gibberellin 20-oxidase encoded gene to paradise tree (*Melia azedarach* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 2, pp. 217-222, 2011.
- [5] L. K. Ly, T. P. Bui, P. T. Do, A. V. T. Le, P. Van Nguyen, and N. B. Pham, "Demonstration of improved plant growth and biomass production by *At1g73160* promoter-controlled root-preferential expression of the *AtGA20ox* gene," *Research Square*, 2020, doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-19585/v42020>.
- [6] S. Huang, A. S. Raman, J. E. Ream, H. Fujiwara, R. E. Cerny, and S. M. Brown, "Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*," *Plant physiology*, vol. 118, pp. 773-781, 1998.
- [7] E.-J. Park, H.-T. Kim, Y.-I. Choi, C. Lee, V. P. Nguyen, and H.-W. Jeon, "Overexpression of gibberellin 20-oxidase1 from *Pinus densiflora* results in enhanced wood formation with gelatinous fiber development in a transgenic hybrid poplar," *Tree Physiology*, vol. 35, pp. 1264-1277, 2015.
- [8] Y.-X. Hu, Y.-B. Tao, and Z.-F. Xu, "Overexpression of *Jatropha* Gibberellin 2-oxidase 6 (*JcGA2ox6*) Induces Dwarfism and Smaller Leaves, Flowers and Fruits in *Arabidopsis* and *Jatropha*," *Frontiers in Plant Science*, vol. 8, pp.1-12, 2017.
- [9] V. T. Bui, X. D. Do, V. S. Le, and H. H. Chu, "The high frequency of transformation procedure for expression of *gus* gene in chinaberry tree (*Melia azedarach* L.) using *Agrobacterium*," *Journal of Biology*, vol. 35, pp. 227-233, 2013.
- [10] V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Hanoi: Hanoi National University Publishing House, 2013.
- [11] E. Carrera, J. Bou, J. L. García-Martínez, and S. Prat, "Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants," *The Plant Journal*, vol. 22, pp. 247-256, 2000.
- [12] J. Binenbaum, R. Weinstain, and E. Shani, "Gibberellin Localization and Transport in Plants," *Trends in Plant Science*, vol. 23, pp. 410-421, 2018.
- [13] T. B. Le, V. C. Phan, V. H. Nong, N. H. Truong, and Q. H. Le, *Application of molecular techniques in the study of biological resources in Vietnam*. Ha Noi: Science and Technology Publishing House, 2003.
- [14] M. Israelsson, B. Sundberg, and T. Moritz, "Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen," *Plant J*, vol. 44, pp. 494-504, Nov. 2005.
- [15] H. W. Jeon, J. S. Cho, E. J. Park, K. H. Han, Y. I. Choi, and J. H. Ko, "Developing xylem-preferential expression of *PdGA20ox1*, a gibberellin 20-oxidase 1 from *Pinus densiflora*, improves woody biomass production in a hybrid poplar," *Plant Biotechnol J*, vol. 14, pp. 1161-70, Apr 2016.