

REGENERATION OF TRANSGENIC SOYBEAN PLANTS CARRYING THE STRUCTURE *pZY102::GmDREB7A* THROUGH SELECTION BY PHOSPHINOTHRICIN

Nguyen Thi Hai Yen¹, Duong Thu Ha², Tran Thi Hong³, Nguyen Duc Hung³, Chu Hoang Mau^{3*}

¹TNU - University of Sciences, ²Bac Giang Department of Education and Training

³TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/5/2023	Soybean is a crop sensitive to drought and salinity stress, so research on measures to improve drought and salinity tolerance of soybean is a matter of current concern. The DREB protein is a transcription factor that enhances the expression of genes related to drought and salinity tolerance in soybean; however, there are many <i>DREB</i> genes in soybean whose function is still unknown. This study aimed to create transgenic soybean plants to evaluate the role of the <i>GmDREB7</i> gene on genes involved in the abiotic stress tolerance of soybean. The methods of genetic transformation, regeneration, in vitro selection and analysis of transgenic plants were used to create transgenic soybean plants for the functional study of the <i>GmDREB7</i> gene. From 150 samples transformed with <i>pZY102::GmDREB7A</i> construct, 447 shoots were obtained, and 17 <i>in vitro</i> <i>GmDREB7A</i> transgenic plants were obtained after three screenings with phosphinothricin (ppt). In vitro cloning and selection of T0 plants by ppt obtained 8 soybean lines, denoted T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8. Analysis of 8 lines of ppt-resistant soybeans in greenhouses by PCR resulted in 7 PCR-positive transgenic soybean lines (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8). The <i>GmDREB7A</i> transgenic soybean lines continued to be monitored and analyzed in subsequent generations.
Revised: 08/6/2023	
Published: 16/6/2023	
KEYWORDS	
Genetic transformation	
<i>GmDREB7A</i> transgene	
Phosphinothricin	
Regeneration <i>in vitro</i>	
Transgenic soybean	

TÁI SINH CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GENE MANG CẤU TRÚC *pZY102::GmDREB7A* THÔNG QUA CHỌN LỌC BẰNG PHOSPHINOTHRICIN

Nguyễn Thị Hải Yến¹, Dương Thu Hà², Trần Thị Hồng³, Nguyễn Đức Hùng³, Chu Hoàng Mậu^{3*}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên, ²Sở Giáo dục và Đào tạo Bắc Giang

³Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/5/2023	Đậu tương là loại cây trồng mẫn cảm với hạn và mặn, do vậy nghiên cứu biện pháp tăng cường khả năng chống chịu hạn và mặn của cây đậu tương là vấn đề đang được quan tâm. Protein DREB là nhân tố phiên mã làm tăng cường biểu hiện các gene liên quan đến tính chịu hạn và mặn của đậu tương, tuy nhiên đến nay còn nhiều gene <i>DREB</i> ở đậu tương còn chưa rõ chức năng. Nghiên cứu này nhằm tạo cây đậu tương chuyển gene phục vụ đánh giá vai trò của gene <i>GmDREB7</i> đối với các gene liên quan đến tính chống chịu hạn và mặn của cây đậu tương. Các phương pháp biến nạp di truyền, tái sinh, chọn lọc <i>in vitro</i> và phân tích cây chuyển gene đã được sử dụng để tạo cây đậu tương chuyển gene phục vụ nghiên cứu chức năng của gene <i>GmDREB7</i> . Từ 150 mẫu được biến nạp cấu trúc <i>pZY102::GmDREB7A</i> đã thu được 447 chồi và qua 3 lần sàng lọc bằng phosphinothricin (ppt) đã thu được 17 cây <i>in vitro</i> được chuyển gene <i>GmDREB7A</i> . Nhân dòng <i>in vitro</i> và chọn lọc các cây T0 bằng ppt thu được 8 dòng đậu tương, ký hiệu là T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8. Kết quả phân tích PCR 8 dòng đậu tương kháng ppt trong nhà lưới thu được 7 dòng dương tính với PCR (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8). Các dòng đậu tương chuyển gene <i>GmDREB7A</i> tiếp tục được theo dõi và phân tích ở các thế hệ tiếp theo.
Ngày hoàn thiện: 08/6/2023	
Ngày đăng: 16/6/2023	
TỪ KHÓA	
Biến nạp di truyền	
Gene chuyển <i>GmDREB7A</i>	
Phosphinothricin	
Tái sinh <i>in vitro</i>	
Đậu tương chuyển gene	

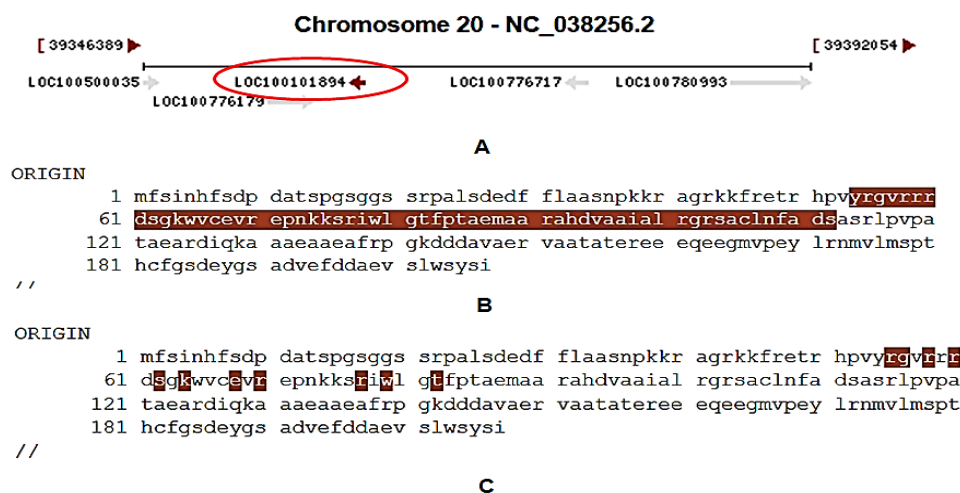
DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7932>

* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Đậu tương là cây thực phẩm có giá trị cao về dinh dưỡng, kinh tế và nâng cao độ phì đất trồng trọt [1]. Đậu tương rất mẫn cảm và chịu ảnh hưởng của các nhân tố hạn, mặn, lạnh... Ở đậu tương cũng như các loại cây trồng khác, tính kháng và chịu đựng các stress phi sinh học do sản phẩm của nhiều gene biểu hiện, trong đó có gene mã hoá protein là nhân tố phiên mã (transcription factor: TF) [2]. Các protein DREB (Dehydration responsive element binding) thuộc họ nhân tố phiên mã AP2/ERF, có vai trò điều hoà biểu hiện một số gene cảm ứng với các stress phi sinh học, như hạn, mặn [3]. Phân họ gene mã hoá nhân tố phiên mã DREB ở đậu tương có ít nhất 18 gene phân bố trên 17 nhiễm sắc thể, *GmDREB3* là gene có số copy nhiều nhất (8 copy) [4]. Sản phẩm protein của các gene DREB có thể cải thiện khả năng chống chịu stress phi sinh học ở đậu tương bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của các gene ở phía xuôi dòng liên quan đến khả năng chống chịu stress môi trường [5]. Một số gene thuộc phân họ DREB đã được xác định có vai trò điều chỉnh khả năng chịu hạn, chịu mặn [3], [6]-[8]. Vai trò và ứng dụng thực tiễn của các gene *DREB* trong cải tiến cây trồng, chẳng hạn như chọn giống bằng chỉ thị phân tử, nâng cao khả năng chống chịu của đậu tương cũng đã được thảo luận [9]. Vì vậy, tìm kiếm gene của phân họ DREB ở đậu tương có chức năng điều chỉnh phiên mã của các gene phản ứng với các stress hạn, mặn,... đang được quan tâm nghiên cứu. Biến nạp di truyền được coi là công cụ mạnh mẽ sử dụng trong nghiên cứu hệ gene chức năng và hầu hết các thông tin hiện có về chức năng gene đều dựa trên các hệ thống biểu hiện. Đồng thời, bằng kỹ thuật chuyển gene, nhiều dòng chuyển gene với các đặc điểm nông học, dinh dưỡng và dược phẩm, bao gồm cả dòng đậu tương chịu thuốc diệt cỏ đã được tạo ra, chiếm tỷ lệ gần 50% diện tích cây công nghệ sinh học toàn cầu [10].

GmDREB7A của đậu tương có ID là 100101894 [11] nằm trên nhiễm sắc thể số 20 (Hình 1A), chứa vùng mã hóa có 624 nucleotide và protein của nó có 207 amino acid. Protein *DREB7A* chứa miền AP2 có 59 amino acid (Hình 1B) và có 11 amino acid liên kết với trình tự *cis* của DNA (DNA binding) (Hình 1C). *GmDREB7A* trong hệ gene đậu tương là một gene mới và chức năng của gene này được xác định chức năng bằng kỹ thuật chuyển gene gián tiếp nhờ *Agrobacterium tumefaciens* và phân tích sự biểu hiện nó ở cây chuyển gene.



Hình 1. Một số thông tin về gene *DREB7A* của đậu tương. A: Vị trí của gene *DREB7A*; B: Trình tự amino acid và vùng AP2 trong protein *DREB7A*; C: các điểm DNA binding trong AP2

Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu này trình bày kết quả biến nạp cấu trúc mang gene *GmDREB7A* và tái sinh *in vitro* nhằm tạo cây đậu tương chuyển gene phục vụ phân tích vai trò của gene *GmDREB7* đối với khả năng chống chịu các stress phi sinh học như hạn, mặn của cây đậu tương.

2. Phương pháp nghiên cứu

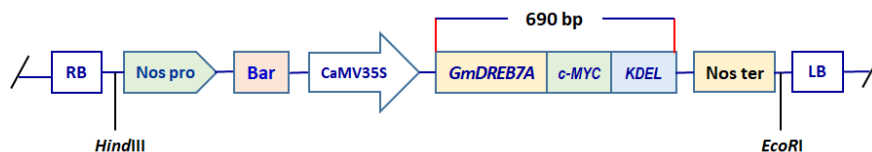
2.1. Vật liệu

Hạt đậu tương ĐT26 (Hình 2) đã khử trùng được nảy mầm trên môi trường GM trong bình tam giác. Thu lá mầm và tách hai mảnh lá mầm, cắt bỏ cuống lá mầm, gây tổn thương ở vị trí nách lá mầm. Mảnh lá mầm được sử dụng làm vật liệu nhận gene. Giống đậu tương ĐT26 thuộc bản quyền của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm và được trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam.



Hình 2. Hình ảnh hạt đậu tương ĐT26 được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gene

Chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A* [12] được sử dụng trong chuyển gene gián tiếp vào mô nách lá mầm. Vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A* chứa promoter CaMV35S, gene chuyển *GmDREB7A* (624 bp), c-MYC (33 bp) và KDEL (12 bp) và các vị trí cắt của enzyme giới hạn. Vector chuyển gene *pZY* chứa gene *Bar* mã hóa protein kháng phosphinothricin (ppt), cấu trúc vector được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Các thành phần chính của vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng hạt đậu tương

Hạt của giống đậu tương ĐT26 được khử trùng bằng khí clo. Hạt đặt trong bình kín chứa 80 ml Javen và 9 ml HCl trong thời gian 16 h.

2.2.2. Biến nạp di truyền, tái sinh và chọn lọc *in vitro* cây đậu tương chuyển gene

Thí nghiệm chuyển gene *GmDREB7A* vào mô lá mầm giống đậu tương ĐT26 nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được thực hiện dựa trên phương pháp của Olhoft và cộng sự (2001) [13] và Nguyễn Thu Hiền và cộng sự [14].

Sau khi khử trùng, hạt đậu tương được nảy mầm trên môi trường GM với thành phần gồm muối B53,052 g/L, sucrose 20 g/L, gellanin 2,5 g/L ở pH = 5,8, bổ sung vitamin B5 1000X 1ml/L. Mảnh lá mầm đã gây tổn thương và được lây nhiễm bởi *A.tumefaciens* chứa vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A* và chuyển sang môi trường đồng nuôi cây (CCM) gồm: muối B5 0,316g/L, BAP 1,7 mg/L + MES 3,9g/L + GA3 0,25mg/L, sucrose 30 g/L, agar 6 g/L ở pH = 5.4, bổ sung acetosyringone 0,04 g/L và vitamin B5 1000X 1 mL/L.

Tiếp theo chuyển mẫu biến nạp sang môi trường tái sinh đa chồi (SIM), với chất chọn lọc phosphonothricin (ppt). Môi trường SIM gồm: muối B53,052 g/L, MES 0,59 g/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L ở pH = 5,8, bổ sung BAP 1,67 mg/L, cefotaxim 500 mg/L, vitamin B5 1000X 1 ml/L và ppt 2 mg/L. Các chồi sống sót được chuyển sang môi trường kéo dài chồi (SEM) gồm: MS 4,3 g/L, MES 0,59 g/L, sucrose 30 g/L, nước dừa 200 ml/L, gellan 2,5 g/L, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxim

500 mg/L, vitaminB5 1000X 1 ml/L, GA₃ 500 mg/L, IAA 100 mg/L, L-Asparagine monohydrate 50mg/L, ppt 2 mg/L. Các chồi sống sót và sinh trưởng mạnh được chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây đậu tương được chuyển gene hoàn chỉnh. Môi trường tạo rễ (RM) gồm: MS 4,3 g/L, sucrose 20 g/L, MES 0,59g/L, gellan 2,5 g/L, pH = 5,8 có bổ sung cefotaxim 250mg/L, IBA 100 mg/L, vitaminB5 1000X 1mL/L, L-Asparagine monohydrate 50 mg/L, ppt 2 mg/L.

2.2.3. Chọn lọc cây đậu tương được chuyển gene ở giai đoạn nhà lưới

Chất chọn lọc được sử dụng trong giai đoạn nhà lưới là ppt. Chọn lọc các dòng cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A* trong nhà lưới được thực hiện theo phương pháp của Brettschneider và cộng sự (1997) [15] trên cơ sở đánh giá khả năng kháng ppt. Khi cây xuất hiện các lá mới, lá của cây chuyển gene được phết 2 mg/L để xác định sự có mặt của gene chọn lọc *bar* trong cây được chuyển gene *GmDREB7A*.

2.2.4. Phân tích cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A* bằng PCR

DNA tổng số của các dòng đậu tương chuyển gene được tách chiết từ lá bằng phương pháp sử dụng CTAB của Dellaporta và cộng sự (1983) [16].

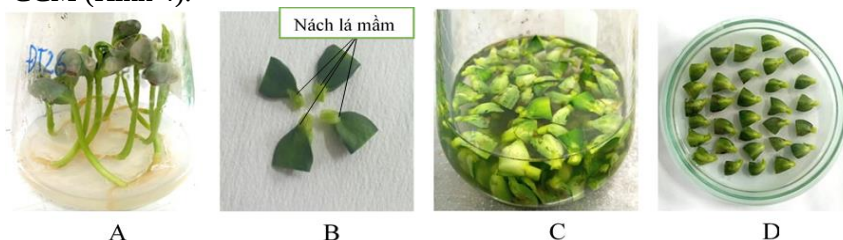
PCR với cặp mồi đặc hiệu *GmDR-F/ Cmyc-Kdel-R* được sử dụng để xác định sự có mặt của gene *GmDREB7A* trong cây đậu tương chuyển gene. Mồi *GmDR-F* có trình tự 5'-ATGTTTTCATCAATCATTCTCC-3' và mồi *Cmyc-Kdel-R* có trình tự: 5'-AAGTTCATCCTTCAGGTCCTC-3'. Thành phần PCR khuếch đại gene *GmDREB7A* từ đậu tương gồm: DNA khuôn 1,5 µL, Master mix 2X 7,5 µL, mồi xuôi và mồi ngược 1,0 µL, H₂O 15 µL và tổng thể tích là 25 µL. Chu trình nhiệt của PCR gồm: 94°C trong 3 phút; lặp lại 27 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 55°C-30 giây, 72°C-1 phút; 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm của phản ứng được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1,0 %.

3. Kết quả và thảo luận

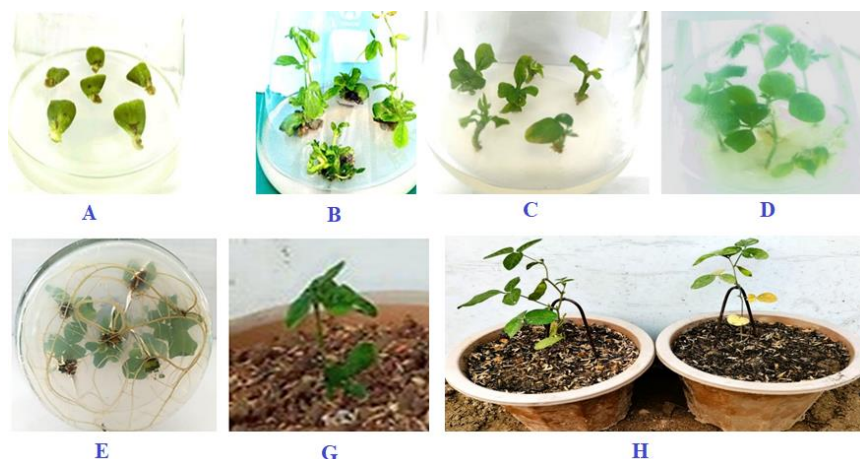
3.1. Nhiễm khuẩn và tái sinh cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A*

Biến nạp di truyền gene chuyển *GmDREB7A* vào mô nách lá mầm giống đậu tương ĐT26 nhờ *A. tumefaciens* AGL1 chứa vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A*. Sau khi được nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang *pZY102::GmDREB7A*, mảnh lá mầm được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM (Hình 4).



Hình 4. Hình ảnh hạt đậu tương ĐT26 nảy mầm (A), mảnh lá mầm (B), lây nhiễm *A.tumefaciens* (C) và đồng nuôi cấy (D)

Mẫu biến nạp đã nhiễm khuẩn được rửa bằng cefotaxim 500 mg/L, thấm khô và cấy chuyển sang môi trường tái sinh đa chồi SIM1 và SIM2, môi trường kéo dài chồi SEM, môi trường ra rễ RM để tạo cây chuyển gene *in vitro*. Chất chọn lọc *in vitro* ppt được bổ sung cho cả ba môi trường SIM, SEM và RM. Các cây đậu tương biến nạp gene *GmDREB7A* được chuyển sang trồng trên giá thể trong môi trường nhà lưới (Hình 5).



Hình 5. Tái sinh và chọn lọc cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A*. A, B: Mẫu biến nạp gene *GmDREB7A* và chồi tái sinh trên môi trường SIM; C: Chồi sinh trưởng trên môi trường SEM; D, E: Chồi ra rễ trên môi trường RM; G: Cây được chuyển gene *GmDREB7A* trồng trên giá thể; H: Cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A* trong điều kiện nhà lưới

Kết quả chuyển cấu trúc *pZY102::GmDREB7A* vào mô nách lá mầm đậu tương ĐT26 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả chuyển gene *GmDREB7A* vào giống đậu tương ĐT26

Đối chứng và thí nghiệm		Tổng số hạt đem gieo	Số mẫu cấy và mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi trên SIM	Số chồi trên SEM	Số chồi ra rễ trên RM	Số cây trồng ra giá thể	Số cây trồng trong nhà lưới
Đối chứng (ĐC)	ĐC0	50	30	21	37	25	12	10	7
	ĐC1	50	30	0	0	0	0	0	0
Thí nghiệm	Lần 1	50	80	41	128	41	14	4	1
	Lần 2	50	80	58	169	60	23	8	4
	Lần 3	50	80	46	150	58	19	5	3
Tổng số		150	240	145	447	159	56	17	8

Ghi chú: ĐC1: Mảnh lá mầm không lây nhiễm *A.tumefaciens* trên môi trường chứa phosphonothricin; ĐC0: Mảnh lá mầm không lây nhiễm *A.tumefaciens* trên môi trường không chứa phosphonothricin.

Trong lô thí nghiệm, quá trình biến nạp với 240 mảnh lá mầm được thực hiện 3 lần, kết quả có 145 mẫu tạo được 447 chồi. Các chồi được chọn lọc trên môi trường SIM (ppt 2 mg/L), kết quả chọn được 159 chồi và chuyển sang môi trường SEM (ppt 2 mg/L). Kết quả chọn lọc ở SEM thu được 56 chồi sống sót và chuyển sang môi trường ra rễ (RM). Tiếp tục chọn lọc ở môi trường RM thu được 17 cây. Nhân dòng 17 cây tạo ra 34 cây /17 dòng ở T0. Chuyển 17 cây thuộc 17 dòng ra trồng trên giá thể. Cuối cùng có 8 dòng cây sống sót và sinh trưởng tốt trong điều kiện nhà lưới. Tiếp tục nhân dòng trong ống nghiệm từ 8 dòng cây T0 này nhằm mục đích lưu giữ cây chuyển gene *in vitro*. Các dòng T0 được ký hiệu là T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T0-7 và T0-8. Kết quả tái sinh ở hai lô đối chứng thu được 7 cây không chuyển gene đem trồng trong nhà lưới.

Như vậy, có 17 dòng cây biến nạp cấu trúc *pZY102::GmDREB7A* T0 được đem trồng trên giá thể và 8 dòng đậu tương T0 sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới.

3.2. Phân tích cây đậu tương được chuyển gene *GmDREB7A*

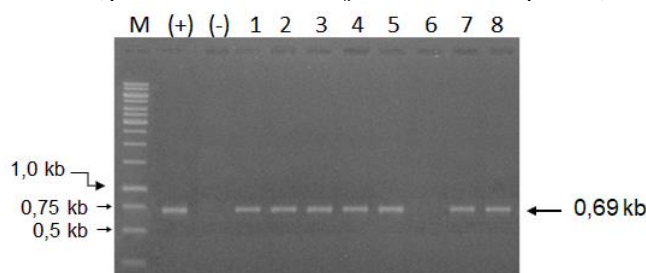
3.2.1. Chọn lọc cây đậu tương chuyển gene *GmDREB7A* bằng ppt

Các dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7A* ở thế hệ T0 sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới được tiếp tục chọn lọc bằng ppt. Chọn thời điểm cây đậu tương chuyển gene được 3 -4 lá để đánh giá tính kháng của cây chuyển gene với ppt trong điều kiện nhà lưới.

Phết trực tiếp ppt 2 mg/L lên bề mặt trên phiến lá để test sự biểu hiện của gene *bar* của mỗi dòng chuyển gene và cây không chuyển gene. Kết quả thu được cả 8 dòng cây chuyển gene (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T07 và T0-8) có khả năng kháng ppt, trong khi lá các cây không chuyển gene vàng dần và héo chết. Các dòng chuyển gene tiếp tục phân tích bằng PCR.

3.2.2. Phân tích sự có mặt của gene chuyển *GmDREB7A* trên cây đậu tương ĐT26 chuyển gene

Tiến hành phân tích 8 dòng cây T0 (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T07 và T0-8) kháng ppt trong nhà lưới bằng PCR với cặp mồi GmDR-F/ Cmyc-Kdel-R, kết quả được trình bày ở hình 6.



Hình 6. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhận gene *GmDREB7A* từ các dòng cây chuyển gene và cây WT. M: Thang DNA 1 kb; (+): Đối chứng dương là vector *pZY_GmDREB7A*; 1-8: Các dòng chuyển gene T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T07, T0-8

Kết quả điện di ở hình 6 cho thấy, một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 0,69 kb ứng với kích thước của gene chuyển *GmDREB7A* có ở các dòng T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T07, T0-8; dòng T0-6 không xuất hiện băng DNA. Gene *GmDREB7A* trong vector chuyển gene *pZY102::GmDREB7A* có kích thước 690 bp, kết quả phân tích các dòng đậu tương T0 thu được vạch DNA có kích thước khoảng 690 bp là cơ sở để có thể bước đầu kết luận gene *GmDREB7A* đã được biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT26 và tạo được 7 dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7A* (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T07, T0-8).

4. Kết luận

Cấu trúc *pZY102::GmDREB7A* đã được biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT26 qua nách lá mầm nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* và tạo được 447 chồi/240 mẫu biến nạp. Kết quả chọn lọc bằng ppt ở môi trường SIM là 159 chồi, ở môi trường SEM là 56 chồi, ở môi trường RM là 17 cây. Nhân dòng 17 cây T0 trong ống nghiệm, chọn lọc bằng ppt thu được 34 cây T0 thuộc 17 dòng chuyển gene *GmDREB7A*, trong đó có 8/17 dòng cây sống sót và sinh trưởng tốt trong điều kiện nhà lưới. Kết quả hai lần sàng lọc 8 dòng cây chuyển gene (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-6, T07, T0-8) trong điều kiện nhà lưới với ppt 2mg/L đã thu được cả 8 dòng chuyển gene sinh trưởng, phát triển bình thường, trong khi lá của cây WT mất màu xanh lục chuyển dần sang vàng, khô và quăn lại vài ngày sau thì chết. Phân tích 8 dòng đậu tương chuyển gene ở T0 bằng PCR đã thu được 7 dòng dương tính (T0-1, T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T07, T0-8). Bảy dòng đậu tương chuyển gene *GmDREB7A* từ giống ĐT26 tiếp tục được theo dõi và phân tích ở các thế hệ tiếp theo.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp Bộ, mã số B2023-TNA-26. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. L. Tran, *Soybean Plant*. Hanoi Agricultural Publishing House, 2000.
- [2] H. M. Chu, T. T. H. Nguyen, V. T. T. Nguyen, and H. H. Chu, *Genes and tolerant characteristics of soybean*. VNU Publishing House, 2011.

- [3] Q. H. Nguyen, L. T. K. Vu, L. T. N. Nguyen, N. T. T. Pham, Y. T. H. Nguyen, S. V. Le, and M. H. Chu, "Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants," *Scientific Reports*, vol. 9, 2019, Art. no. 19663.
- [4] T. N. L. Nguyen, P. Vaciata, T. C. Nguyen, H. Q. Nguyen, T. T. N. Pham, T. T. T. Vu, and H. M. Chu, "Characteristics and phylogeny of DREB gene subfamily in soybeans [*Glycine max* (L.) Meril]," *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, vol. 63, no. 2, pp. 60-64, 2021.
- [5] C. Lata and M. Prasad, "Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants," *Journal of experimental botany*, vol. 62, pp. 4731-4748, 2011.
- [6] Q. Jiang, Z. Hu, H. Zhang, and Y. Ma, "Overexpression of *GmDREB1* improves salt tolerance in transgenic wheat and leaf protein response to high salinity," *Crop J.*, vol. 2, pp. 120-131, 2014, doi: 10.1016/j.cj.2014.02.003.
- [7] T. T. N. Pham, H. Q. Nguyen, T. N. L. Nguyen, X. T. Dao, D. T. Sy, V. S. Le, and H. M. Chu, "Overexpression of the *GmDREB2* gene increases proline accumulation and tolerance to drought stress in soybean plants," *Australian Journal of Crop Science*, vol. 14, pp. 495-503, 2020.
- [8] M. Chen, Z. Xu, L. Xia, L. Li, X. Chen, J. Dong, Q. Wang, and Y. Ma, "Cold-induced modulation and functional analyses of the DREbinding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.)," *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, pp. 121-135, 2009.
- [9] N. Rahmawati, Rosmayati, D. Delvian, B. Mohammad, and O. Hirosuke, "Evaluation of resistance improvement of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) against salinity using mass selection and gene expression of salinity tolerant," *Proceedings of the International Conference on Natural Resources and Technology (ICONART)*, 2019, pp. 30-37.
- [10] M. S. Homrich, B. Wiebke-Strohm, R. L. Weber, and M. H. Bodanese-Zanettini, "Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants," *Genet Mol Biol.*, vol. 35, pp. 998-1010, 2012, doi: 10.1590/s1415-47572012000600015.
- [11] National Center for Biotechnology Information, "Dehydration-responsive element binding protein 7 [*Glycine max* (soybean)]," Gene ID: 100101894. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=100101894>. [Accessed May 10, 2023].
- [12] T. Q. Tu, T. M. T. Bui, V. Sysouphanh, T. H. Y. Nguyen, T. N. L. Nguyen, and H. M. Chu, "Generating gene expression construct and agrobacterium-mediated transformation of *GmDREB7A* in tobacco," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 10, pp. 17-25, 2022, doi: 10.34238/tnu-jst.6066.
- [13] P. M. Olhoft, C. M. Donovan, and D. A. Somers, "Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants," *Methods in molecular biology*, vol. 343, pp. 385-396, 2001.
- [14] T. H. Nguyen, H. M. Chu, H. H. Chu, and V. S. Le, "Study on regeneration and genetic transformation via cotyledons node of two soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merrill) DT12 and DT84 by *Agrobacterium*," *Vietnamese Journal of Biotechnology*, vol. 8, pp. 1305-1310, 2011.
- [15] R. Brettschneider, D. Becker, and H. Lörz, "Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos," *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, pp. 737-748, 1997.
- [16] S. L. Dellaporta, J. Wood, and J. B. Hicks, "A plant DNA miniprep: version II," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 1, pp. 19-21, 1983.