

TRANSFORMATION OF *Escherichia coli* MODIFIED *gdhA* GENE INTO *Nicotiana tabacum***Pham Thi Hang¹, Nguyen Thuy Linh¹, Le Bac Viet¹, Nguyen Thi Kim Lien¹,
Le Thi Thu Hien^{1,2}, Huynh Thi Thu Hue^{1,2,*}**¹Institute of Genome Research, VAST, Vietnam²Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 3 August 2017, accepted 3 March 2019

ABSTRACT

The *gdhA* gene from *Escherichia coli* encoding a NADPH-GDH was expressed in tobacco plants exhibited high growth performance and enhanced herbicide resistance as well as drought tolerance. In addition, the *gdhA* gene when expressed in maize plants could increase productivity because of improving stress tolerance. In this study, we isolated and analyzed a *gdhA* gene from the *E. coli* strain JM109. Then, the *E. coli* derived-*gdhA* sequence was modified by using OptimumGene™ software for plant compatibility. The optimized *gdhA* gene was inserted into an expression cassette containing the CaMV 35S promoter and the 35S terminator of the pRTRA7/3 vector. The 35S::*gdhA*::35S construct was ligated into the plant expression plasmid pCAMBIA1300 which then introduced into the *A. tumefaciens* strain EHA105. In order to examine the expression of the *gdhA* gene, we created *gdhA*-transgenic plants via *Agrobacterium*-mediated transformation into *N. tabacum* K326. The PCR analysis showed that two out of 20 plants were positive to the presence of the *gdhA* gene. The RT-PCR experiment also revealed that *gdhA* was expressed at transcriptional level. These results suggested that the *gdhA* expression construction can be transformed into other crops such as maize.

Keywords: *E. coli*, genetic modification, genetic transformation, *gdhA* gene, tobacco.

Citation: Pham Thi Hang, Nguyen Thuy Linh, Le Bac Viet, Nguyen Thi Kim Lien, Le Thi Thu Hien, Huynh Thi Thu Hue, 2019. Transformation of *Escherichia coli* modified *gdhA* gene into *Nicotiana tabacum*, 41(1): 69–82. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n1.10588>.

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

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

CHUYỂN GEN CẢI BIẾN *gdhA* CÓ NGUỒN GỐC *Escherichia coli* VÀO CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana tabacum*

Phạm Thị Hằng¹, Nguyễn Thùy Linh¹, Lê Bắc Việt¹, Nguyễn Thị Kim Liên¹,
Lê Thị Thu Hiền^{1,2,*}, Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2,*}

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

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

Ngày nhận bài 3-8-2017, ngày chấp nhận 3-3-2019

TÓM TẮT

Gen *gdhA* mã hoá cho NAPH-GDH từ vi khuẩn *E. coli* khi biểu hiện trong cây thuốc lá đã làm tăng cường khả năng chống chịu thuốc bảo vệ thực vật, tăng sinh khối thực vật và tăng khả năng chịu hạn. Khi biểu hiện gen *gdhA* ở cây ngô giúp tăng năng suất... nhờ cải thiện khả năng chịu đựng hạn của cây. Với mục đích có nguồn gen giá trị này, chúng tôi tiến hành phân lập gen *gdhA* từ chủng vi khuẩn *E. coli* JM109, tạo dòng và xác định trình tự gen *gdhA* để tìm sự khác biệt về gen trong chủng hiện có. Đồng thời, chúng tôi thực hiện cải biến trình tự gen *gdhA* bằng phần mềm OptimumGeneTM cho phù hợp với thực vật. Gen *gdhA* sau khi cải biến được ghép nối với promoter CaMV 35S và 35S terminator trong vector trung gian pRTRA 7/3 để tạo cấu trúc biểu hiện 35S::*gdhA*::35S. Cấu trúc này đã được chuyển vào vector pCAMBIA1300 tạo nên vector biểu hiện thực vật mang gen *gdhA* và biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105. Để kiểm tra sự biểu hiện của gen *gdhA* chúng tôi tiến hành chuyển cấu trúc biểu hiện gen *gdhA* vào cây mô hình thuốc lá *N. tabacum* K326 thông qua *A. tumefaciens*. Phân tích sự có mặt của gen trong 20 dòng cây thuốc lá chuyển gen bằng PCR và RT-PCR cho thấy 2 trong số 20 dòng thuốc lá chuyển gen có mang gen *gdhA* hoạt động ở mức độ phiên mã tạo mRNA. Sự biểu hiện của cấu trúc này ở cây thuốc lá cho thấy có thể sử dụng cấu trúc mang gen để chuyển gen *gdhA* vào cây trồng đích như cây ngô.

Từ khoá: *E. coli*, cải biến gen, cây thuốc lá, chuyển gen, gen *gdhA*.

*Địa chỉ liên hệ email: hthue@igr.ac.vn

MỞ ĐẦU

Khô hạn là một nguyên nhân quan trọng làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm của cây trồng. Khi môi trường khô hạn, cây bị stress mất nước dẫn đến nhiều hậu quả nghiêm trọng (Abdullah et al., 2011; Belkheiri & Mulas, 2013). Vì vậy, để sống sót trong điều kiện hạn hán, thực vật đã hình thành nên nhiều cơ chế chống chịu. Trong phản ứng với sự thiếu nước, thực vật tích lũy một số chất chuyển hoá như đường (trehalose, sorbitol và mannitol), amino axit (proline và asparagine) và amin (glycine betain và polyamines).

Trong số này, việc tích lũy amino acid tự do đường như có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ thực vật (Good & Zaplachinski, 1994; Rhodes et al., 1999), nhưng sự tích lũy amino acid được điều chỉnh như thế nào khi thâm hụt nước vẫn chưa được nghiên cứu làm rõ. Glutamate đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh hoạt động của nhiều con đường, đặc biệt là quá trình trao đổi amino acid (Forde & Lea, 2007), sự trao đổi chất cacbon (Lam et al., 1998), chuyển hóa amino acid (Noctor et al., 2002) và đồng hoá nitrate (Stitt et al., 2002). Glutamate dehydrogenase từ vi khuẩn (GDH, E.C. 1.4.1.1) và thực vật

(E.C. 1.4.1.2) xúc tác cho phản ứng thuận nghịch. Với quá trình đồng hoá, GDH là một trong số ít các enzyme có khả năng amin hóa khử của một axit hữu cơ để tạo ra một amino acid; α -ketoglutarate được sử dụng để sản xuất glutamate với sự hiện diện của NAD(P)H (Wooton, 1983). Đối với quá trình dị hóa, GDH là một enzyme có khả năng giải phóng amino nitơ từ các amino acid để tạo ra axit keto và NH₃ có thể được tái chế riêng để sử dụng trong quá trình chuyển hóa cacbon và sự hình thành amide, đặc biệt là trong quá trình già hoá (Aubert et al., 2001; Loulakakis et al., 2002). GDH có thể tham gia tổng hợp glutamate để cung cấp khung carbon cho chu trình TCA và sản xuất năng lượng khi thiếu hụt carbon (Dubois et al., 2005; Kichey et al., 2005; Tercé-Laforgue et al., 2004). Ở vi khuẩn, ammoni được đồng hóa thành amino acid dựa trên glutamate và aminotransferases. Ở thực vật, nghiên cứu đã cho thấy GDH được cảm ứng tăng cường biểu hiện khi lượng gốc tự do tăng lên bởi những stress vô sinh (Skopelitis et al., 2006). Như vậy, giữa thực vật và vi khuẩn có những điểm tương đồng đáng chú ý trong hệ gen. Nhiều gen ở vi khuẩn liên quan đến khả năng chống chịu các điều kiện môi trường stress khác nhau đã được xác định. Sự biểu hiện của các protein vi khuẩn liên quan này được biểu hiện ở thực vật đã trực tiếp hoặc gián tiếp bảo vệ cây chống lại các stress của môi trường như khô hạn, mặn, nhiệt độ thấp. Thực vật chuyển gen *GDHs* của vi khuẩn đã được cải thiện đáng kể tính chống chịu với chất bảo vệ thực vật, và trong điều kiện thiếu nước.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy, gen *gdhA* mã hoá cho NAPH-GDH từ vi khuẩn *E. coli* khi biểu hiện trong cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* cv. 'SR1') làm tăng cường khả năng chống chịu thuốc bảo vệ thực vật phosphinitricin (PPT), làm tăng sinh khối thực vật, hàm lượng axit amin tự do và carbohydrate (Ameziane et al., 2000), tăng khả năng chịu hạn (Mungur et al., 2006). Các enzyme GDH phụ thuộc NADPH được mã hoá bởi gen *gdhA* của *E. coli* khi biểu hiện trong ngô cũng cải thiện sức sống của cây trong điều kiện thiếu nước (Lightfoot et al., 2007). Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập gen *gdhA* mã hoá cho GDH từ chủng vi khuẩn *E. coli* JM109, cải biến gen này và tái tổ hợp vào vector biểu hiện thực vật để phục vụ công tác chuyển gen vào cây đích là cây ngô. Trước tiên, chúng tôi tiến hành chuyển gen *gdhA* cải biến vào cây mô hình thuốc lá để kiểm tra sự biểu hiện của gen cải biến trong cấu trúc đã được thiết kế.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ba chủng vi khuẩn *E. coli* JM109, chủng *E. coli* DH10 β và chủng *A. tumefaciens* EHA105 đã được lưu giữ tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các vector được sử dụng gồm: vector tách dòng pJET 1.2, vector tách dòng trung gian pRTRA7/3 mang promoter CaMV35S, vector biểu hiện thực vật pCAMIA1300.

Bảng 1. Các cặp primer được thiết kế để nhân gen

Tên mỗi	Trình tự mỗi
gdhAF	5' GAAGGATCCAGGATGGATCAGACATATTCTCT 3'
gdhAR	5' ATTATGCGGCCGCTTATTAATCACACCCTGCGC 3'
gdhABamHIF	5' ACAGATGGATCCGATCAGACATACTCTCTGGAGTC 3'
gdhANotIR	5' AGTGATGCGGCCGCGATCACACCCTG 3'
HptF	5' AAAGCCTGAACTCACCGC 3'
HptR	5' GCTTCCACTATCGGCGA 3'
CaMV35SF	5' CACTGACGTAAGGGATGACGC 3'
cmycR	5' TATCGACGGGATCGGGCTAGAGTTCG 3'

Phân lập gen *gdhA* từ các chủng vi khuẩn

Gen *gdhA* được nhân từ DNA tổng số của 3 chủng vi khuẩn *E. coli* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi *gdhAF/R*. Sản phẩm PCR được tinh sạch theo quy trình của bộ kit GeneJET Gel Extraction Kit của hãng Thermo Scientific và được tạo dòng trong vector pJET1.2 theo quy trình của bộ kit Clone JET Kit của hãng Thermo Scientific.

Xác định và phân tích trình tự gen *gdhA*

Trình tự nucleotide được xác định dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3500. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen và đăng ký lên ngân hàng gen với mã số KT124225.

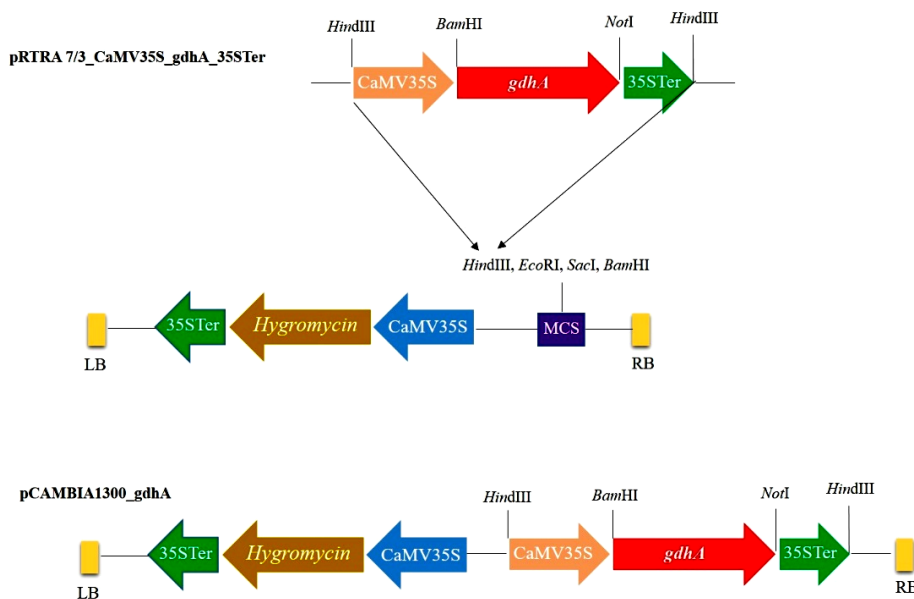
Cải biến gen *gdhA*

Trình tự gen *gdhA* từ vi khuẩn chưa qua cải biến được đưa lên phân tích trên công cụ phân tích codon hiếm để đánh giá chỉ số CAI của gen *gdhA* khi được đưa vào biểu hiện trong cây ngô. Sau khi cải biến, chỉ số CAI tăng lên 0,8–1,0 coi như cải biến thành công. Kiểm tra trình tự amino axit của gen được cải biến bằng phần mềm Expassy để đánh giá mức

độ chính xác của những thay đổi này. Trình tự cải biến được giữ nguyên các đặc điểm của gen trên 2 nucleotide đầu của mỗi mã bộ ba, chỉ cải biến vị trí thứ 3 trên mỗi mã bộ ba. Sau đó, gen được tổng hợp hoàn chỉnh với các mã bộ ba đã cải biến.

Thiết kế vector mang cấu trúc biểu hiện *CaMV35S::gdhA::35S*

Vector tách dòng pJET1.2 mang gen *gdhA* đã cải biến được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR với primer *gdhABamHIF/NotIR* nhân đoạn gen *gdhA* treo điểm nhận biết của *BamHI* và *NotI* nhằm gắn với vector trung gian pRTRA7/3 đã được xử lý *BamHI* và *NotI*. Vector pRTRA7/3 có chứa cấu trúc *CaMV35S::35S* gồm promoter *CaMV35S* và terminator *35S*, gen *gdhA* được chèn vào giữa promoter và terminator để tạo cấu trúc biểu hiện *CaMV35S::gdhA::35S*. Sau đó toàn bộ cấu trúc được đọc trình tự để kiểm tra lại tính chính xác của gen cũng như điểm nối. Đoạn cấu trúc biểu hiện gen được cắt với *HindIII* và ghép nối với vector biểu hiện thực vật pCAMBIA 1300 đã mở vòng với *HindIII* (hình 1). Vector tái tổ hợp pCAMBIA1300 được biến nạp vào *A. tumefaciens* theo phương pháp xung điện.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *gdhA*

Chuyển gen *gdhA* vào cây thuốc lá mô hình *N. tabacum* K326 theo phương pháp mảnh lá (Topping, 1998)

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp chứa gen *gdhA* được nuôi cấy trong môi trường có kháng sinh chọn lọc kanamycin và rifamycin trong 48 giờ, sau đó nuôi phục hồi cho tới khi đạt $OD_{600nm} = 0,7$. Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn, hoà tan trong môi trường $\frac{1}{2}$ MS (Murashige and Skoog medium) để chuẩn bị biến nạp. Các mảnh thuốc lá *N. tabacum* có kích thước 1×1 cm được ngâm trong dịch huyền phù tế bào vi khuẩn trên trong 15 phút. Các mảnh lá này sau đó được tái sinh trên môi trường ra chồi MS có bổ sung BAP (6-benzylaminopurine). Những chồi phát triển tốt được cắt chuyển sang môi trường ra rễ. Khi cây phát triển hoàn thiện về hình thái được chuyển ra giá thể.

Đánh giá cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* thế hệ T0

Khi các cây thuốc lá chuyển gen ra lá mới và phát triển bình thường, chúng tôi tiến hành thu mẫu lá non của cây để tách chiết DNA và RNA tổng số. Các mẫu DNA tổng số sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với 2 cặp mồi: HptF/R và *gdhABamHIF/NotIR* kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen *gdhA* trong cây thuốc lá chuyển gen thế hệ T0. Đồng thời, chúng tôi cũng kiểm tra sự hoạt động phiên mã của gen *gdhA* thông qua phản ứng RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *gdhABamHIF/NotIR*.

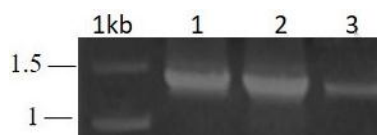
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen *gdhA* từ chủng vi khuẩn *E. coli* JM109

Dựa trên những thông tin về trình tự gen *gdhA* đã công bố trên GenBank, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu *gdhA* F/R cho phản ứng PCR nhân đoạn gen *gdhA*. Trong nghiên cứu này, DNA tổng số được tách chiết từ ba chủng vi khuẩn *E. coli* (JM109, Top10, DH5 α) theo phương pháp tách DNA tổng số của Sambrook et al. (1989).

Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn mẫu là DNA, sử dụng enzyme DreamTaq polymerase với cặp mồi *gdhA* F/R nhiệt độ

gắn mồi 63°C. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% (hình 2) cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn *E. coli*: JM109, Top10, DH5 α cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 1,4 kb. Các băng đều sáng, rõ nét, kích thước này phù hợp theo tính toán của chúng tôi khi thiết kế cặp mồi nhân gen *gdhA*.



Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *gdhA*: Đường chạy 1: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA tổng số tách từ chủng JM109, đường chạy 2: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA tổng số tách từ chủng Top10, đường chạy 3: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA tổng số tách từ chủng DH5 α

Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là gen *gdhA*, chúng tôi đã tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *gdhA* trên Ecogene. Plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen ngoại lai được xác định trình tự bằng máy giải trình tự ABI 3500, sử dụng cặp mồi pJET1.2F/R. Kết hợp giữa kết quả giải trình tự mồi pJET1.2F và pJET1.2R, chúng tôi thu được trình tự đầy đủ của gen *gdhA* có kích thước 1344bp. Kết quả xác định trình tự được xử lý bản phân mềm BioEdit và so sánh trình tự này với trình tự tham chiếu trên Ecogene (mã số: EG10372), cho thấy gen *gdhA* phân lập được có độ tương đồng 100%. Trình tự gen *gdhA* phân lập được đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số KT124225 (hình 3).

Như đã đề cập, *gdhA* là một gen từ vi khuẩn, do đó nếu chuyển vào thực vật mà không được cải biến sẽ khó có sự biểu hiện của protein trong tế bào thực vật chuyển gen. Sở dĩ có hiện tượng này là do sự khác biệt giữa tỉ lệ nucleotide AT và GC trong bộ gen của vi khuẩn và thực vật. Từ đó, một chỉ số (CAI-codon adoption index) được đưa ra để đánh giá và phân tích độ tương thích của các bộ 3 mã hóa codon trong sự biểu hiện của gen trong một vật chủ khác loài. Để đánh giá được

chỉ số này, phần mềm tin sinh OptimumGene™ được sử dụng. Bằng các thuật toán được sử dụng trong phần mềm, gen phân lập từ một nguồn khác biểu hiện trên vật chủ mới phải có chỉ số CAI đạt từ 0,8–1,0; đây được coi là chỉ số tối ưu cho biểu hiện của gen đó lên tế bào vật chủ khác loài. Một

protein có khả năng biểu hiện cao khi chỉ số CAI của nó trong chủng chủ từ 0,8 trở lên. Giá trị tuyệt đối chỉ tần suất sử dụng cao nhất của một codon nhất định trong chủng chủ là 100, trong khi những codon có tần suất sử dụng dưới 30 có khả năng làm cản trở sự biểu hiện protein.



Hình 3. So sánh trình tự đoạn gen *gdhA* phân lập được từ vi khuẩn *E. coli* JM109

Thông thường, khi một gen được biểu hiện trên một tế bào vật chủ khác loài, chỉ số CAI có xu hướng thấp hơn 0,8. Vì vậy, để gen *gdhA* có thể biểu hiện được protein có hoạt tính tốt nhất trong thực vật yêu cầu cần phải cải biến các nucleotide trên gen *gdhA* cho phù hợp với thực vật bằng cách làm tăng chỉ số

CAI đạt 0,8–1,0. Trên thực tế, nguyên lí cải biến gen từ vi sinh vật để thích hợp cho chuyển gen là làm tăng tỷ lệ % GC trong bộ gen bằng cách thay đổi nucleotide thứ 3 trong bộ 3 mã hóa có nhiều AT của vi khuẩn chuyển thành nucleotide G hoặc C với điều kiện không làm thay đổi amino axit được mã hóa

bởi codon đó. Tuy nhiên, trong thực tế, khi thay đổi mã quá sâu sắc để đưa chỉ số CAI đến 1,0, có thể lúc đầu protein được biểu hiện rất tốt nhưng sau đó dễ bị đào thải không rõ nguyên nhân. Vì vậy, thông thường sự cải biến được định hướng chỉ tối ưu một phần mã bộ ba để nâng chỉ số CAI của gen lên khoảng 0,8 là thích hợp nhất. Kết thúc quá trình cải biến, gen được tổng hợp theo con đường hóa học để làm nguyên liệu cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Trình tự gen *gdhA* được phân lập từ vi khuẩn *E. coli* JM109 khi đưa lên phân tích trên công cụ OptimumGeneTM-Codon Optimization cho kết quả chỉ số CAI chỉ đạt 0,69. Do đó, cần có sự cải biến gen tại những codon chứa nhiều nucleotide A và T thành các codon chứa nhiều G và C thích hợp cho biểu hiện trong thực vật mà không làm ảnh hưởng đến trình tự amino axit của gen *gdhA* ban đầu.

Trình tự amino axit của gen *gdhA* phân lập từ vi khuẩn *E. coli* JM109 được xác định bằng phần mềm Expasy. Gen *gdhA* phân lập từ vi khuẩn *E. coli* JM109 mã hóa cho một protein gồm 447 amino axit. Trên trình tự của gen *gdhA* có 202 bộ ba codon giàu AT có thể thay thế tại vị trí nucleotide thứ 3 thành các bộ ba giàu GC thích hợp ở thực vật. Tỷ lệ các bộ ba giàu AT trên gen *gdhA* của vi khuẩn chiếm 45,19% trên toàn bộ gen. Sau khi xác định các bộ ba giàu AT trong gen *gdhA* phân lập được từ vi khuẩn, dựa vào bảng mã hóa amino axit để tiến hành thay thế nucleotide thứ 3 trong các bộ ba mã hóa mà không làm thay đổi amino axit trong trình tự protein gen đó mã hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn các bộ ba mã hóa nhằm nâng cao chỉ số CAI của gen, các bộ ba này phải phân bố đều trên gen đồng thời phải có chỉ số các amino axit gây ảnh hưởng không tốt lên biểu hiện gen (negative CIS elements) thấp nhất có thể (< 3 negative). Kết quả lựa chọn các bộ ba để thay thế được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Trình tự các bộ ba mã hóa amino axit được thay thế

STT	Bộ ba mã hóa gốc	Bộ ba mã hóa sau cải biến	Số lượng trong gen <i>gdhA</i>
1	TAT	TAC	5
2	AAT	AAC	8
3	ATT	ATC	4
4	TTA	TTG	1
5	ATA	ATC	1
6	TTT	TTC	11
7	CTA	CTG	2
8	GTA	GTG	2
9	AAA	AAG	18
10	CGT	CGC	5
11	GTT	GTG	16
Tổng			72

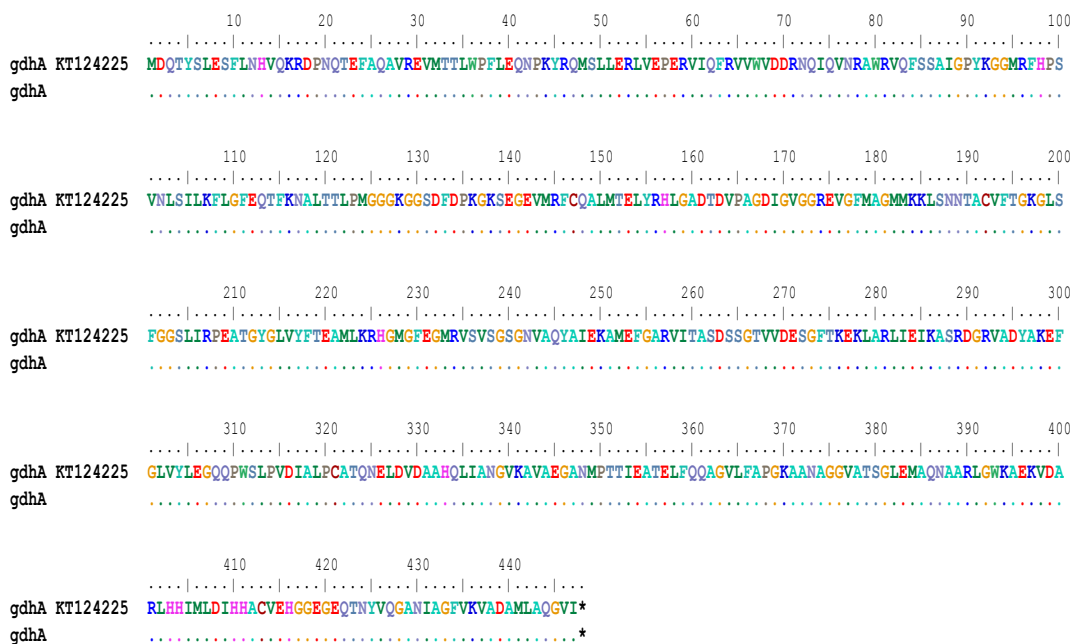
Trên trình tự gen *gdhA* cải biến, các bộ ba TAT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 5, 45, 56, 213 và 300 được thay thế bằng bộ ba TAC. Bộ ba AAT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 20, 42, 118, 190, 322, 325, 345 và 370 được thay thế bằng bộ ba AAC. Bộ ba ATT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 106, 207, 428 và 444 được

thay thế bằng bộ ba ATC. Bộ ba TTA tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 50 được thay thế bằng bộ ba TTG. Bộ ba ATA tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 74 được thay thế bằng bộ ba ATC. Bộ ba TTT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 38, 63, 112, 147, 179, 202, 231, 255, 301 và 368, 436 được thay thế bằng bộ ba TTC. Bộ ba

CTA tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 314, 367 được thay thế bằng bộ ba CTG. Bộ ba GTA tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 31, 366 được thay thế bằng bộ ba GTG. Bộ ba AAA tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 44, 92, 108, 112, 124, 132, 134, 180, 225, 251, 277, 279, 287, 299, 343, 372, 396 và 399 được thay thế bằng bộ ba AAG. Bộ ba CGT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 78, 81, 146, 258 và 287 được thay thế bằng bộ ba GCG. Bộ ba GTT tại vị trí codon mã hóa cho acid amin thứ 28, 55, 68, 102, 165, 172, 217, 236, 238, 270, 316, 331, 342, 416 và 439 được thay thế bằng bộ ba GTG.

Gen *gdhA* được cải biến tại 72 codon chứa nhiều AT và nucleotide thứ 3 được chuyển đổi

thành G hoặc C nhưng không làm thay đổi trình tự amino axit. Sau khi cải biến, thành phần GC trong gen đã tăng từ 53,57% lên 59,05% và chỉ số CAI của gen *gdhA* tương thích biểu hiện trong cây ngô đã tăng lên 0,81, một chỉ số phù hợp cho việc chuyển gen sau cải biến vào biểu hiện trong cây ngô. Trình tự gen *gdhA* sau khi cải biến được kiểm tra trình tự amino axit bằng phần mềm BioEdit để xác định mức độ chính xác của những thay đổi này (hình 4). Kết quả phân tích cho thấy, việc thay đổi nucleotide trong đoạn gen *gdhA* đã suy biến không hề làm thay đổi trình tự amino axit của gen *gdhA* ban đầu. Đoạn gen *gdhA* thu được đã đáp ứng được yêu cầu cho việc biểu hiện trong thực vật và hoàn toàn có thể sử dụng trong việc chuyển gen vào thực vật.



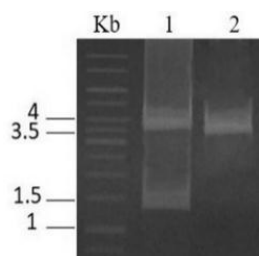
Hình 4. Trình tự amino axit của gen *gdhA* đã qua cải biến

Thiết kế gen *gdhA* trong vector trung gian *pRTRA 7/3*

Để biểu hiện gen trong tế bào thực vật, gen *gdhA* cần được đặt dưới sự điều khiển của promoter và terminator thích hợp. Chúng tôi lựa chọn promoter CaMV35S và 35S terminator để điều khiển sự hoạt động của gen *gdhA* trong thực vật. Trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật, CaMV 35S promoter

là một trong những promoter cơ định được sử dụng rộng rãi nhất. CaMV 35S promoter được sử dụng rộng rãi nhờ khả năng điều khiển sự biểu hiện của các gen ngoại lai ở nhiều loại mô (Odell et al., 1985; Jefferson et al., 1987) của nhiều loại cây khác nhau như: lúa (Terada & Shimamoto, 1990; Battraw & Hall, 1990), khoai tây (Visser et al., 1991), củ cải đường (Lindsey & Gallois, 1990), đậu tương (Yang

& Christou, 1990), ngô (Rhodes et al., 1988), cải dầu (Fry et al., 1987), và dưa (Dong et al., 1991). Đoạn gen *gdhA* cải biến được tạo dòng trong vector pJET1.2, plasmid tái tổ hợp mang gen *gdhA* đã cải biến được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp mồi *gdhABamHI*F và *gdhANotI*R, đoạn gen được nhân lên với cặp mồi này sẽ có kích thước 1.344 bp bao gồm toàn bộ vùng CDS của gen sau đó được ghép nối với vector tách dòng trung gian pRTRA có kích thước 4.247 bp chứa đoạn trình tự cần thiết cho biểu hiện gen gồm promoter CaMV35S và 35S terminator, gen đích được chèn vào giữa tại điểm nhận biết của *BamHI* và *NotI*. Đồng thời, sản phẩm PCR nhân gen *gdhA* sử dụng cặp mồi *gdhABamHI*F - *gdhANotI*R cũng được xử lý bằng *BamHI* và *NotI* để thu được đoạn gen *gdhA* dạng đoạn *BamHI* - *NotI*. Sản phẩm gen *gdhA* và vector pRTRA sau khi xử lý enzyme đã được lai với nhau và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10b và tiến hành chọn lọc bằng enzyme *BamHI* và *NotI*. Kết quả điện di sản phẩm xử lý enzyme này cho thấy đoạn DNA 1.344 bp (hình 5) đã xuất hiện, chứng tỏ đoạn gen *gdhA* đã được ghép nối vào vector pRTRA tạo cấu trúc CaMV35S::*gdhA*::35S.



Hình 5. Kết quả cắt enzyme giới hạn *BamHI* và *NotI* trên plasmid pRTRA7/3: Đường chạy 1: Vector pRTRA + *gdhA* cắt với *BamHI* và *NotI*; đường chạy 2: Vector pRTRA7/3 mở vòng với *BamHI* và *NotI*

Vùng gen *gdhA* trong vector pRTRA+*gdhA* sau đó được xác định trình tự bằng cặp mồi CaMV35SF và *mycR* để đảm bảo không có sự thay đổi trình tự nucleotide trong gen và các vị trí ghép nối vào vector. Kết quả xác định và so sánh trình tự gen *gdhA* gắn điểm *BamHI*-*NotI* với gen *gdhA* đã xác định trình tự trước đó cho thấy hoàn toàn

không có sự sai khác nucleotide. Đồng thời các vị trí gắn của gen với vùng CaMV35S và 35Sster không có sự sai khác. Plasmid pRTRA+*gdhA* được tiếp tục sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *gdhA*

Hiện nay, có nhiều phương pháp chuyển gen được các nhà khoa học sử dụng để chuyển gen vào thực vật như: phương pháp gián tiếp sử dụng *A. tumefaciens*, phương pháp trực tiếp sử dụng xung điện, vi tiêm, xử lý polyethylene glycol (PEG) và dùng súng bắn gen. Mỗi phương pháp chuyển gen đều có những ưu, nhược điểm riêng tùy vào từng loài cây khác nhau. Trong đó phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* đem lại hiệu quả cao và ít tốn kém nhất. Một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của thí nghiệm chuyển gen vào thực vật đó là lựa chọn được hệ vector biểu hiện phù hợp. Trong nghiên cứu này, hệ vector pCAMBIA được lựa chọn để biểu hiện gen *gdhA* trong thực vật. Hệ thống pCAMBIA có những ưu điểm như: (1) Có số lượng bản sao lớn trong *E. coli* nên lượng DNA thu được lớn; (2) Vùng replicon pVS1 cho mức độ ổn định cao trong *Agrobacterium*; (3) Kích thước nhỏ, 7-12 kb tùy thuộc vào từng plasmid; (4) Các điểm cắt enzyme giới hạn cho phép dễ dàng lắp ráp/ chèn gen quan tâm; (5) Chọn lọc vi khuẩn bằng chloramphenicol hoặc kanamycin; (6) Chọn lọc thực vật bằng hygromycin B hoặc kanamycin; (7) dễ dàng thiết kế các cấu trúc dung hợp biểu hiện với gen chỉ thị *gusA* (<https://www.cambia.org>).

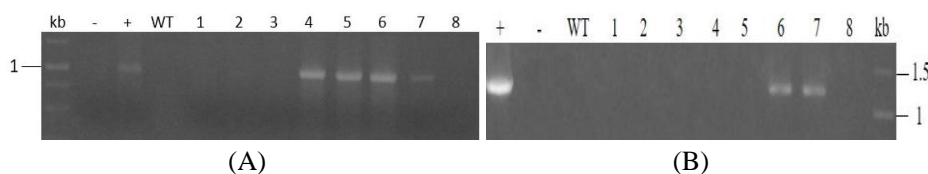
Đoạn cấu trúc biểu hiện CaMV35S::*gdhA*::35S được gắn đúng có kích thước khoảng 2,2 kb và được chuyển vào vector biểu hiện pCAMBIA1300 để tạo vector chuyển gen. Kết quả kiểm tra vector pCAMBIA 1300 tái tổ hợp với cấu trúc CaMV35S::*gdhA*::35S được thể hiện ở hình 6A, plasmid pCAMBIA 1300 tái tổ hợp được cắt với *HindIII* cho kết quả một đoạn DNA hơn 9 kb đúng với kích thước vector pCAMBIA 1300 đối chứng khi cắt mở vòng bằng *HindIII*. Trong khi đó, băng DNA phía dưới có kích thước khoảng 2,2 kb bằng đoạn

Bảng 3. Kết quả chuyển gen vào cây thuốc lá mô hình *N. tabacum* K326

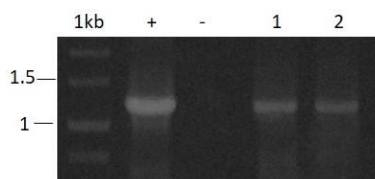
Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi tái sinh	Số cây thu được
100	74	37	20

Khi cây đã ra lá mới và phát triển bình thường, mẫu lá non của tất cả các cây thuốc lá chuyển gen được thu ngẫu nhiên để tách chiết DNA tổng số và PCR kiểm tra. Trong nghiên cứu này, phản ứng PCR được thực hiện sử dụng hai cặp mồi: Cặp mồi Hpt F/R nhân đoạn gen mã hoá cho gen chỉ thị kháng Hygromycin và cặp mồi nhân gen đích *gdhABamHIF/NotIR*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR được thể hiện trên hình 8. Kết quả điện di cho thấy, khi PCR với cặp mồi HptF/R có 4 mẫu: 10, 13, 15 và 18 (tương ứng với các đường chạy: 4, 5, 6 và 7 trên gel agarose) xuất hiện băng DNA có kích thước

tương đương với đối chứng dương, trong khi đó khi PCR bằng cặp mồi nhân gen đích chỉ có 2 mẫu xuất hiện đoạn DNA có kích thước tương đương với kích thước sản phẩm PCR của mẫu đối chứng dương (mẫu số 15 và 18 tương ứng với đường chạy số 6 và 7 trên gel agarose). Như vậy, có thể khẳng định rằng, trong 20 mẫu cây non thu được 2 mẫu mang cấu trúc biểu hiện gen *gdhA*: Số 15 và số 18. Các cây dương tính với phản ứng PCR được giữ lại, tiếp tục quan sát phục vụ những phân tích, đánh giá khả năng hoạt động và biểu hiện của gen.



Hình 8. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây thuốc lá chuyển gen T0 bằng PCR, (A): PCR kiểm tra bằng cặp mồi nhân gen *Hygromycin* (HptF/R): (-): PCR từ nước, (+): PCR từ plasmid *pCAM1300_gdhA*; WT: PCR từ DNA tổng số của cây thuốc lá không chuyển gen; 1–8: PCR từ DNA tổng số của một số cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* (tương ứng với các cây: 1, 4, 7, 10, 13, 15, 18); (B): PCR kiểm tra bằng cặp mồi nhân gen *gdhA*: (-): PCR từ nước, (+): PCR từ plasmid *pCAM1300_gdhA*; WT: PCR từ DNA tổng số của cây thuốc lá không chuyển gen; 1–8: PCR từ DNA tổng số của một số cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* (tương ứng với các cây: 1, 4, 7, 10, 13, 15 và 18)



Hình 9. Kết quả kiểm tra gen *gdhA* trong cây thuốc lá T0 bằng RT-PCR: (+): PCR từ plasmid *pCAM1300_gdhA*; (-): PCR từ nước; 1–2: RT-PCR từ cDNA của 2 cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* 15 và 18

Tuy nhiên, PCR dương tính không đồng nghĩa với chuyển gen thành công vì có nhiều cách để giải thích sự có mặt của DNA trong mẫu phân tích: (1): Trong các nghiên cứu

chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*, loài vi khuẩn này thường tồn tại lâu dài trong mô tế bào thực vật mặc dù đã trải qua quá trình loại bỏ vi khuẩn và chọn lọc tế bào thực vật chuyển gen. (2): Gen chuyển tồn tại tự do trong tế bào chất, có thể biến mất qua sinh sản hữu tính, (3): Gen chuyển không biểu hiện thành protein có chức năng sinh học. Do đó, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để xác định khả năng hoạt động của gen *gdhA* trong các cây thuốc lá chuyển gen dương tính với phản ứng PCR. Đây là kỹ thuật cho phép phát hiện sự biểu hiện của gen chuyển thông qua hoạt động phiên mã của gen ngoại lai trong cây thuốc lá chuyển gen. Các tổng cây thuốc lá được tách chiết RNA số, thực hiện tổng hợp cDNA sợi

thứ nhất theo bộ kit của hãng Affymetrix và sau đó tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *gdhABamHIF/gdhANotIR*. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (hình 9).

Kết quả điện di cho thấy, ở cả 2 đường chạy đều xuất hiện đoạn DNA với kích thước tương đương với kích thước của mẫu đối chứng. Như vậy, cả hai cây thuốc lá chuyển gen T0 chuyển gen dương tính với PCR đều mang gen hoạt động phiên mã tạo sản phẩm mRNA. Hai cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* thế hệ T0 dương tính với phản ứng RT-PCR được tiếp tục theo dõi phục các phân tích tiếp. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy năng suất của cây trồng bị ảnh hưởng bởi rất nhiều các yếu tố khách quan bên ngoài. Một trong số đó là hạn hán do ức chế sự phát triển và làm giảm quá trình quang hợp ở cây. Lightfoot et al. (2007) khi nghiên cứu sự biểu hiện của gen *gdhA* của *E. coli* mã hoá cho enzyme GDH phụ thuộc NADPH trong cây ngô đã chỉ ra gen *gdhA* giúp cây ngô tăng năng suất trong một vài năm, đặc biệt trong môi trường stress hạn, do đó sự tăng năng suất có thể là do sự cải thiện khả năng chịu đựng stress hạn của cây ngô chuyển gen *gdhA*. Các tác giả cũng chỉ ra những cây ngô chuyển gen *gdhA* có khả năng chịu được mất nước trong 7 ngày, đồng thời khả năng quang hợp của các chuyển gen *gdhA* trong điều kiện hạn cũng không giảm đi nhiều trong khi các cây không chuyển gen thì quá trình quang hợp bị giảm đáng kể. Hơn nữa, nghiên cứu trước đó của Mungur và cộng sự (2006) cũng chỉ ra cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* có khả năng chịu đựng mất nước tốt hơn các cây không chuyển gen. Cơ chế để gen *gdhA* giúp tăng cường khả năng chịu đựng sự thiếu nước ở thực vật có thể liên quan đến sự thay đổi lượng glutamate hoặc quá trình trao đổi chất. Trong các nghiên cứu của Ameziane et al. (2000) và Mungur et al. (2005) cho thấy ở lá và rễ của các cây thuốc lá chuyển gen *gdhA* nồng độ của hầu hết amino acid tự do đều nhiều gấp đôi so với bình thường. Các acid amin tăng lên trong cây chuyển gen *gdhA* có thể liên quan đến tăng glutamate, proline và arginine là các chất có hiệu quả ảnh hưởng đến chất thẩm thấu, điều này có thể giải thích

một phần trong việc duy trì nước của các cây chuyển gen *gdhA* dưới điều kiện stress nước. Tuy nhiên, các ảnh hưởng gián tiếp của sinh trưởng và trao đổi chất ảnh hưởng đến khả năng chịu đựng thiếu nước là quá trình rất phức tạp. GDH-NADPH được biểu hiện trong tế bào chất của các cây chuyển gen, trong khi các gen nội sinh tổng hợp các enzyme trong tế bào chất sau đó được chuyển đến ty thể hoặc lục lạp. Các nghiên cứu trong tương lai với cây chuyển gen *gdhA* sẽ tập trung xác định xem chất chuyển hoá nào bị thay đổi và những chất nào liên quan đến khả năng chống chịu mất nước. Như vậy, gen *gdhA* của *E. coli* đã được cải biến để phù hợp với hệ gen của thực vật, khi chuyển gen *gdhA* cải biến vào cây mô hình thuốc lá, đã kiểm tra được sự hoạt động của gen *gdhA* ở mức độ phiên mã.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, gen *gdhA* mã hoá cho NADPH-GDH từ chủng *E. coli* JM109 đã được phân lập và tạo dòng thành công. Đồng thời, gen *gdhA* đã được cải biến cho phù hợp thực vật và tái tổ hợp thành công trong vector biểu hiện pCAMBIA1300 dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S, tạo được chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp này làm nguyên liệu phục vụ chuyển gen thực vật. Kết quả chuyển gen *gdhA* vào cây thuốc lá mô hình *N. tabacum* K326 thu được 20 cây tái sinh và khi tiến hành chọn lọc thu được 2 cây (cây số 15 và cây số 18) có kết quả dương tính với PCR bằng cặp mồi nhân gen đích *gdhABamHIF/gdhANotIR*. Sự hoạt động của gen *gdhA* ở mức độ phiên mã trong các cây này đã được kiểm chứng với RT-PCR. Kết quả bước đầu này cho thấy cấu trúc biểu hiện gen *gdhA* trong vector pCAM/35S-*gdhA* mà chúng tôi thiết kế có thể hoạt động ở cây đích. Các thí nghiệm tiếp theo là chuyển gen này vào cây đích để kiểm tra sự hoạt động của gen *gdhA* trong cây đích và kiểm tra ở mức độ phiên mã, dịch mã và đánh giá tính chịu hạn nhân tạo trên cây đích.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện tại Viện nghiên cứu hệ gen với kinh phí từ đề tài cấp nhà nước “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi

gen”do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý và một phần từ nguồn kinh phí cấp cơ sở.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdullah A. Y., Obeidat B. S., Muwalla M. M., Matarneh S. K., Ishmais M. A. A., 2011. Growth performance, carcass and meat characteristics of black goat kids fed sesame hulls and *Prosopis juliflora* pods. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24(9): 1217–1226.
- Allen G. Good, Steven T. Zaplachinski, 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 90: 9–14.
- Ameziane R., Bernhardt K., Lightfoot D. A., 2000. Expression of the bacterial *gdhA* gene encoding a glutamate dehydrogenase in tobacco and corn increased tolerance to the phosphinothricin herbicide. Martins-Loucao MA, Lips SH (eds) Nitrogen in a sustainable ecosystem, from the cell to the plant. 339–343.
- Ameziane R., Bernhard K., and Lightfoot D., 2000. Expression of the bacterial *gdhA* gene encoding a NADPH glutamate dehydrogenase in tobacco affects plant growth and development. *Plant and Soil*, 221(1): 47–57.
- Aubert D., Chen L., Moon Y. H., Martin D., Castle L. A., Yang C. H., and Sung Z. R., 2001. EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(8): 1865–1875.
- Battraw M. J., Hall T. C., 1990. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*, 15: 527–538.
- Belkheiri O., Mulas M., 2013. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. *Environmental and Experimental Botany*, 86: 17–28.
- Dong J. Z., Yang M. Z., Jia S. R., Chua N. H., 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter in transgenic melon plants. *BioTechnology*, 9: 858–863.
- Forde B. G., and Lea P. J., 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot.*, 58(9): 2339–2358.
- Fry J., Barnason A., Horsch R.B., 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens*-based vectors. *Plant Cell Reports*, 6: 321–325.
- Jefferson R. A., Klass M., Wolf N., Hirsh D., 1987. Expression of chimeric genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, 193(1): 41–46.
- Lam H. M., Hsieh M. H., Coruzzi G., 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16: 345–353.
- Lightfoot D. A., Bernhardt K., Mungur R.; Nolte S., Ameziane R., Colter A., Jones K., Iqbal M. J., Varsa E. C., Young B. G., 2007. Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E. coli*. *Euphytica*, 156: 106–115
- Lindsey K., Gallois P., 1990. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.*, 41: 529–536.
- Loulakakis K. A., Primikirios N. I. Nikolantonakis M. A., Roubelakis Angelakis K. A., 2002. Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L. ferredoxin-dependent glutamate synthase, and its spatial and temporal changes during leaf development. *Planta*, 215: 630–638.
- Mungur R., Glass A. D., Goodenow D.; Lightfoot D. A., 2005. Metabolite fingerprint changes in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. *J. Biomed Biotech.*, 198–214.

- Mungur R., Wood A. J., Lightfoot D. A., 2006. Water potential is maintained during water deficit in *Nicotiana tabacum* expressing the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. *Plant Growth Regulation*, 50: 231–238.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S. D., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer C. H., 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration. *Ann. Bot Lond.*, 89: 841–850.
- Odell J. T., Nagy F., Chua N. H., 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810–812.
- Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J., 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240: 204–207.
- Rhodes D., Verslues P. E., Sharp R. E., 1999. Role of amino acids in abiotic stress resistance. *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, 319–356.
- Skopelitis D. S., Paranychianakis N. V., Paschalidis K. A., Pliakonis E. D., Yakoumakis D., Delis I. D., Kouvarakis A., Papadakis A. K., Stephanou E., Roubelakis-Angelakis K. A., 2006. Abiotic stress generated ROS signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis. *Plant Cell*, 18: 2767–2781.
- Stitt M., Muller C., Matt P., Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W. R., Krapp A., 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.*, 53: 959–970.
- Terada R., Shimamoto K., 1990. Expression of CaMV 35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Molecular and General Genetics*, 220: 389–92.
- Topping J.F. 1998. Tobacco transformation. *Methods Mol Biol.*, 81: 365–372.
- Visser R.G., Stolte A., Jacobsen E., 1991. Expression of a chimaeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.*, 17(4): 691–699.
- Wooton J. C., 1983. Reassessment of ammonium ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases: activation of the *Neurospora crassa* enzyme by ammonium and rubidium ions. *Biochem. J.*, 209: 527–531.
- Yang N. S., Christou P., 1990. Cell type specific expression of a CaMV 35S-gus gene in transgenic soybean plants. *Developmental Genetics*, 11: 289–293.