

BÀI TỔNG QUAN

CÔNG NGHỆ GEN TRONG TẠO CÂY NGÔ CHỊU HẠN VÀ NHỮNG TRIỂN VỌNG MỚI

Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1,2,✉</sup>, Nguyễn Thùy Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Hải Hà<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hthue@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.3.2017

Ngày nhận đăng: 20.02.2018

TÓM TẮT

Hiện nay, cây ngô vẫn là một trong những loại ngũ cốc quan trọng của con người. Nhưng với sự biến đổi của khí hậu toàn cầu thì tình trạng hạn hán đã ảnh hưởng lớn đến sản lượng cây lương thực nói chung và cây ngô nói riêng. Trong những năm gần đây, năng suất và sản lượng ngô ở nhiều khu vực trên thế giới giảm đáng kể do ảnh hưởng của khô hạn. Để khắc phục những hậu quả của sự thiếu nước đối với cây ngô thì nhiều biện pháp đã được áp dụng, trong đó có sử dụng công nghệ gen để chuyển các gen liên quan đến tính chịu hạn vào cây ngô nhằm tăng tính chịu hạn. Các nghiên cứu trên thế giới về cơ chế chịu hạn của thực vật đã tập trung vào những gen quan trọng tạo ra các protein trực tiếp bảo vệ tế bào, những gen mã hóa các yếu tố điều hòa phiên mã hoặc dẫn truyền tín hiệu trong tế bào. Để biểu hiện gen ở mức cao và nhạy ở cây ngô chuyển gen, các gen có thể được cải biến để thích hợp với mã biểu hiện của ngô hay gắn thêm tín hiệu cho sự cải biến sau phiên mã hoặc sau dịch mã. Đồng thời, các nhà nghiên cứu đã tìm hiểu những yếu tố khác như hệ vector dùng cho chuyển gen, các promoter, các chủng vi khuẩn thích hợp.v.v. nhằm nâng cao khả năng biểu hiện của gen. Những nghiên cứu này đã được đầu tư và thu được những kết quả có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Một vài năm gần đây, công nghệ gen còn bao hàm cả công nghệ chỉnh sửa gen dựa trên các hệ thống chỉnh sửa như ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 đang được hoàn thiện và áp dụng trên nhiều đối tượng thực vật cũng như cây ngô. Các công nghệ này hứa hẹn sẽ có tiềm năng lớn trong việc tạo cây ngô có khả năng chịu hạn và tạo những giống cây mới có ưu điểm vượt trội so với các giống truyền thống.

**Từ khóa:** Cây ngô, công nghệ gen, chỉnh sửa gen, chuyển gen, CRISPR/Cas9

MỞ ĐẦU

Những nghiên cứu sử dụng công nghệ gen để tạo giống cây trồng với tính trạng mới là một lĩnh vực công nghệ cao đã phát triển từ những năm 1980. Việc áp dụng công nghệ gen là một bước tiến quan trọng, đã tạo ra nhiều sản phẩm nông nghiệp phục vụ an ninh lương thực toàn cầu. Nhờ sử dụng các kỹ thuật hiện đại này, số lượng các gen có giá trị được chuyển vào bộ gen thực vật cũng như số lượng các loài cây trồng có giá trị được cải thiện chất lượng sản phẩm, tạo tính kháng thuốc diệt cỏ, kháng côn trùng đã tăng lên nhanh chóng. Từ đó đến nay, công nghệ gen vẫn luôn được tập trung nghiên cứu và đổi mới để hoàn thiện hơn nhằm đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về các giống cây trồng mới và đáp ứng với biến đổi khí hậu toàn cầu. Một cây trồng quan trọng trong nông nghiệp là cây ngô đã được áp dụng công nghệ gen trong tạo

giống từ rất sớm và thu được một số thành tựu đáng kể. Các nhà khoa học đã có những nghiên cứu sâu và tổng quát về các gen, các tính trạng quan tâm và rất nhiều yếu tố liên quan đến gen để nâng cao các đặc tính chống chịu như kháng sâu, kháng thuốc diệt cỏ cho ngô. Tuy nhiên, tính trạng chịu hạn cho ngô dù được nghiên cứu từ lâu nhưng vì là một tính trạng đa gen nên cần nhiều nghiên cứu hơn nữa về gen, cơ chế và các kỹ thuật cập nhật, phù hợp. Trong bài viết này, chúng tôi trình bày về những nghiên cứu đã có nhằm đưa ra cái nhìn toàn diện về vấn đề nghiên cứu gen, promoter, vector, và những yếu tố quan trọng khác trong nghiên cứu chuyển gen cây ngô nói riêng và thực vật nói chung cũng như xu hướng về chỉnh sửa gen trong nghiên cứu tạo cây ngô cải thiện tính chịu hạn.

CÂY NGÔ VÀ SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA HẠN HÁN

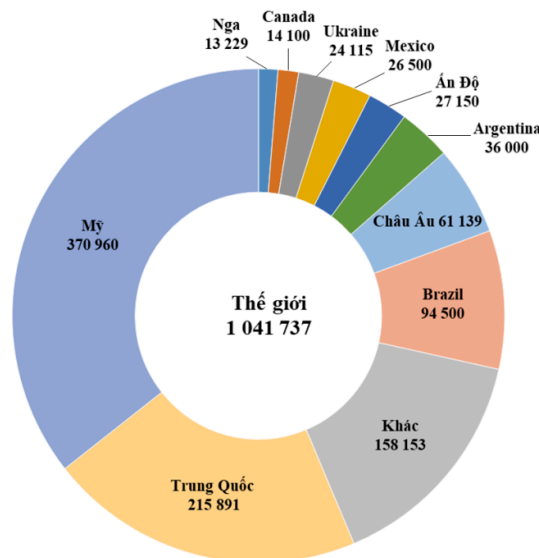
Ngô được cho là một trong những loài cây đầu

tiên được con người thuần hóa và lai tạo khoảng 7000 đến 10000 năm về trước. Ngô có nguồn gốc từ một loài cỏ dại *teosinte* (khá khác với cây ngô ngày nay) ở Mexico (Doebly, 2004). Sau đó, nhờ người châu Mỹ bản địa chọn lọc và trồng các giống phù hợp với tiêu chí của con người, ngô dần dần trở thành một nguồn thức ăn phổ biến. Từ Mexico, cây ngô được đưa sang các khu vực khác nhau của Mỹ Latin, vùng biển Caribbean, sau đó đến Mỹ và Canada. Sau khi Colombo phát hiện ra châu Mỹ, ngô được chuyển đến châu Âu và sau đó là châu Á và châu Phi (Nunn, Qian, 2010). Hạt ngô có hàm lượng tinh bột cao, hàm lượng protein và chất béo thấp, giàu vitamin B và khoáng, nhưng lại ít canxi, folate và sắt. Dù vậy, với năng lượng khoảng 365 kcal/100g, cao hơn so với lúa mì và lúa gạo (Nuss, Tanumihardjo, 2010), ngô được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng cho con người và gia súc. Khoảng 50% tổng sản lượng ngô được dùng làm thức ăn cho động vật và đang ngày một tăng (Wallington *et al.*, 2012). Trong 10 năm trở lại đây, ngô còn được tập trung cho ngành công nghiệp sản xuất ethanol và nhiên liệu.

Ngày nay, ngô được trồng trên khắp thế giới và trở thành một trong 3 loại ngũ cốc quan trọng đối với con người. Theo ước tính của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO) năm 2012, lúa mì, ngô và lúa gạo chiếm đến 94% tổng lượng ngũ cốc được tiêu thụ (FAOSTAT, 2012). Ngô là loại

ngũ cốc có sản lượng cao nhất hàng năm, khoảng 1041,7 triệu tấn vào năm 2017/18 (so với lúa gạo là 486,3 triệu tấn và 758,5 triệu tấn ở lúa mì) (USDA, 2018). Theo số liệu của Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA) trong giai đoạn 2017/18, Mỹ, Trung Quốc và Brazil là 3 quốc gia có sản lượng ngô cao nhất thế giới (Hình 1). Năng suất trung bình của ngô khi trồng ở các khu vực phát triển như Bắc Mỹ hay châu Âu đạt 8,7 tấn/ha và ở các khu vực kém phát triển như châu Á và châu Phi là 3,7 tấn/ha (FAOSTAT, 2012). Sự khác nhau về năng suất ở các khu vực trồng ngô trên thế giới là do sự khác biệt về khí hậu và kỹ thuật canh tác.

Ở Việt Nam, ngô là loại lương thực quan trọng thứ hai sau lúa. Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, cuối năm 2017, diện tích trồng ngô trên cả nước đạt 1,1 triệu ha, năng suất trung bình đạt 4,67 tấn/ha, với tổng sản lượng ước tính đạt 5,1 triệu tấn. Tuy vậy, con số này không đủ để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước. Năm 2017, Việt Nam phải nhập khẩu 7,75 triệu tấn hạt ngô, tương đương với 1,51 tỷ USD để sản xuất thức ăn chăn nuôi. Dù nỗ lực nâng cao sản lượng ngô nội địa, diện tích trồng ngô hiện nay lại có xu hướng giảm do giá bán không ổn định, khí hậu thay đổi ảnh hưởng đến mùa vụ của ngô (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2017).



Hình 1. Sản lượng ngô của một số nước trên thế giới giai đoạn 2017/18 (đơn vị: nghìn tấn) (USDA, 2018).

Hạn hán là tác nhân khí hậu gây ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đến sản lượng ngô toàn thế giới.

Theo ước tính hằng năm, trung bình 15% sản lượng ngô trên thế giới bị mất mát do hạn hán, tương

đương với khoảng 120 triệu tấn hạt và 35 tỷ đô la Mỹ. Tuy nhiên, nếu xét về giá trị phúc lợi xã hội, ở khu vực sa mạc Sahara của châu Phi, giá trị thiệt hại thực tế còn cao hơn nhiều bởi cuộc sống của người dân nơi đây phụ thuộc chủ yếu vào cây ngô (IPCC, 2014).

Mặc dù các đợt hạn hán nghiêm trọng thường được chú ý nhiều, nhưng các đợt hạn hán vừa và nhỏ lại xảy ra nhiều hơn và có ảnh hưởng đáng kể đến diện tích và sản lượng ngô ở nhiều nơi trên thế giới (Jaleel *et al.*, 2009). Theo báo cáo của FAOSTAT, năm 2012, năng suất và sản lượng ngô ở Mỹ giảm tương ứng là 21% và 15% so với giá trị trung bình giai đoạn 2009-2011. Năng suất ngô tại khối các nước châu Âu cũng giảm trung bình 12,5% vào năm 2012 bởi hiện tượng khô hạn (MARS, 2012). Theo Ủy ban Liên chính phủ về Biến đổi khí hậu (IPCC) (2014) dự đoán nhiệt độ trung bình năm ở nhiều khu vực châu Phi sẽ cao hơn 2°C trong khoảng 30 năm tới. Sự tăng nhiệt độ và thay đổi trong lượng mưa sẽ khiến hạn xảy ra thường xuyên hơn. Trong khi đó, hầu hết các diện tích trồng ngô ở châu Phi không được tưới tiêu mà chủ yếu dựa vào nước mưa tự nhiên. Theo Trung tâm Cải tạo Ngô và Lúa Quốc tế (CIMMYT) vào năm 2013, 25% diện tích trồng ngô ở châu Phi đối mặt với hạn hán thường xuyên làm giảm đi một nửa sản lượng ngô ở khu vực này (CIMMYT, 2013). Gần đây, báo cáo của FAOSTAT năm 2017 đã chỉ ra 80% thiệt hại do hạn hán gây ra nằm trong lĩnh vực nông nghiệp, mà chủ yếu là trong trồng trọt và chăn nuôi. Ở Việt Nam, khoảng 80% diện tích trồng ngô phụ thuộc vào nước mưa tự nhiên. Các diện tích này chủ yếu nằm ở khu vực đồi núi phía Bắc và Tây Nguyên. Do hiện tượng biến đổi khí hậu, điều kiện thời tiết ở các khu vực này diễn biến khó lường, nhiều hiện tượng thời tiết cực đoan xảy ra gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất nông nghiệp nói chung và trồng ngô nói riêng. Chính vì vậy, việc tạo ra các giống ngô chịu hạn đã và đang là mục tiêu được các nhà khoa học và các nhà quản lý quan tâm.

Ở ngô, hạn hán gây ảnh hưởng đến toàn bộ chu trình sống, đặc biệt nghiêm trọng nếu hạn xảy ra vào giai đoạn trước và sau khi ra hoa. Khi bị thiếu nước, cây ngô biểu hiện một loạt các triệu chứng như toàn bộ thân và lá sẽ chuyển từ màu xanh sang màu xanh xám, các lá có hiện tượng cuộn lại từ dưới lên trên ngọn, khí khổng đóng lại, quang hợp giảm mạnh, giảm cố định carbon và do đó sinh trưởng bị chậm lại. Nếu cây gặp hạn trước khi ra hoa 7-10 ngày, sự phát triển của bắp sẽ chậm hơn cở, do đó quá trình

phun râu chậm hơn sự tung phấn, điều này dẫn đến khả năng thụ phấn thấp. Nếu hạn nặng ở giai đoạn ra hoa có thể dẫn đến việc mất hoàn toàn bắp và do đó mất năng suất (Chapman, Edmeades, 1999). Nếu hạn hán xảy ra trong thời gian tạo hạt, bắp ngô sẽ có ít hàng hạt và các hàng không có nhiều hạt (Edmeades *et al.*, 2000). Như vậy, hạn hán dù ngắn hay dài, nhẹ hay nghiêm trọng cũng ảnh hưởng không nhỏ đến sản lượng và năng suất của ngô.

Các nhà khoa học và người trồng ngô đã sử dụng nhiều phương thức khác nhau để làm tăng khả năng sống sót của cây qua hạn hán. Hai phương thức chính là di truyền (tức là tác động vào genome giúp cây trồng chịu được hạn) và nông học (tức là thay đổi quá trình canh tác hoặc môi trường để giảm khả năng gặp hạn cho cây trồng). Với thực tế ở Việt Nam và nhiều nước đang phát triển trên thế giới, phần lớn ngô được trồng ở những khu vực đồi núi, hệ thống thủy lợi chưa phát triển, tưới tiêu chủ yếu dựa vào nước mưa tự nhiên, phương thức nông học khó thực hiện, nhất là ở quy mô lớn. Trong khi đó, phương thức di truyền giúp tạo ra cây trồng chịu được hạn mang lại nhiều tiềm năng hơn. Phương thức này gồm phương pháp lai tạo giống truyền thống kết hợp chỉ thị phân tử và phương pháp sử dụng công nghệ gen.

## CÔNG NGHỆ GEN TRONG TẠO CÂY NGÔ CHỊU HẠN

### Sự phát triển công nghệ chuyển gen ở cây ngô

Công nghệ gen, hay kỹ thuật di truyền, dù mới chỉ bắt đầu từ những năm 1980 đến nay nhưng đã thu được nhiều thành tựu quan trọng trong nhiều lĩnh vực. Trong lĩnh vực tạo giống cây trồng, công nghệ gen giúp tạo ra các giống cây biến đổi gen mang các gen mới có nguồn gốc từ chính loài đó hoặc từ các loài khác. Điều này giúp cây trồng biến đổi gen có thêm các tính trạng mới như khả năng chống chịu với môi trường, khả năng kháng thuốc diệt cỏ và kháng côn trùng, cũng như tăng hoặc giảm các tính trạng nội tại. Bắt đầu từ năm 1995 với giống cây chuyển gen đầu tiên được thương mại hóa, đến năm 2014, đã có 147 nghiên cứu được công bố về cây trồng biến đổi gen (Klumper, Qaim, 2014). Một nghiên cứu tổng quát bởi Klumper và Qaim (2014) cho thấy, việc chấp nhận và trồng cây biến đổi gen đã làm tăng 22% năng suất cây trồng và làm tăng lợi nhuận của người nông dân đến 68%, giảm 37% lượng thuốc trừ sâu được sử dụng.

Công nghệ tạo cây ngô biến đổi gen bắt đầu có

những tiến triển lớn từ khi phương pháp chuyển gen bằng tế bào trần thành công trong phòng thí nghiệm vào năm 1988. Tuy nhiên, các nhà khoa học mất hai năm sau đó để hoàn thiện hệ thống tái sinh và tạo ra cây ngô biến đổi gen đầu tiên (Rhodes *et al.*, 1988). DNA có thể được chuyển vào trong tế bào trần của cây ngô khá hiệu quả nhờ xung điện hoặc polyethylene glycols (PEG) (Omirulleh *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000). Không lâu sau, phương pháp sử dụng súng bắn gen cũng cho thấy khả năng tạo ra các thể biến nạp có khả năng sinh sản cao khi sử dụng mô đích là môi trường nuôi cấy tế bào phôi huyền phù hoặc mô sẹo. So sánh với chuyển gen bằng tế bào trần, các sự kiện chuyển gen bằng súng bắn gen cho cây có khả năng sinh sản tốt hơn. Koziel *et al.*, (1993) sử dụng phôi chưa trưởng thành để làm đích cho quá trình bắn gen và đã thành công khi chuyển gen *CryIAb* và chỉ thị BAR. Từ đó, các nhà khoa học đã cải tiến các yếu tố như nguồn vật liệu ngô đích, các tham số của quá trình bắn gen để hoàn thiện công nghệ. Nhiều cây ngô biến đổi gen thương mại hiện nay là thành quả của công nghệ này. Các phương pháp chuyển gen vật lý khác cũng được phát triển để tạo cây ngô biến đổi gen gồm phương pháp xung điện (D'Halluin *et al.*, 1992), chuyển gen thông qua tinh thể silicon carbide (Frame *et al.*, 1994), và chùm tia aerosol (Eby *et al.*, 2004).

Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* là một phương pháp chuyển gen gián tiếp lần đầu tiên được công bố vào giữa những năm 1980 cho thấy khả năng chuyển DNA vào tế bào ngô khá cao (Grimsley *et al.*, 1987). Một vài năm sau, Gould *et al.*, (1991) công bố chuyển gen thành công vào ngô sử dụng đỉnh chồi làm mô đích. Tuy nhiên, phải đến khi Ishida *et al.*, (1996) mô tả quy trình chuyển gen vào phôi chưa trưởng thành bằng vi khuẩn *Agrobacterium* chứa một vector đa nguồn với gen *vir* từ pTiBo524, phương pháp này mới bắt đầu được sử dụng và chấp nhận ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Nhiều yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen ngô, như điều kiện chọn lọc và tái sinh đã được tối ưu hóa cho phương pháp này (Li *et al.*, 2003; Frame *et al.*, 2006; Hiei *et al.*, 2006). Chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium* vẫn là phương pháp được chọn lựa để sử dụng trong các nghiên cứu tạo nhiều sự kiện biến đổi gen và phát triển giống thương mại. Các sự kiện chuyển gen ngô có thể chuyển đơn gen hoặc một tập hợp các gen với nhau, bao gồm các gen có liên quan đến các tính trạng được quan tâm.

Công nghệ chuyển gen vào ngô mới bắt đầu từ

những năm 1990 nhưng đã nhanh chóng được áp dụng để tạo ra những cây ngô biến đổi gen có chất lượng và năng suất cao. Cây ngô biến đổi gen kháng sâu đầu tiên chứa gen *Bt* được thương mại hóa vào năm 1995. Kể từ đó, các giống ngô kháng sâu và kháng thuốc diệt cỏ được chấp nhận và trồng ở khắp nơi trên thế giới, đây được coi là thế hệ cây ngô chuyển gen đầu tiên. Đặc biệt, diện tích trồng các giống ngô chứa một tập hợp vài gen hoặc mang vài tính trạng mới cho kháng côn trùng cánh vẩy, kháng sâu rầy và thuốc diệt cỏ tăng nhanh đáng kể. Năm 2012, 88% diện tích trồng ngô là ngô biến đổi gen đã giúp làm giảm đáng kể lượng khí nhà kính và giảm sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Trong khi việc chấp nhận các thế hệ đầu tiên của ngô biến đổi gen được mở rộng, thế hệ thứ hai đang được phát triển với nhiều triển vọng hơn. Các tính trạng của thế hệ thứ hai được thiết kế để giúp ngô phát triển ở điều kiện hạn, sử dụng nitrogen tốt hơn, tăng năng suất cao hơn, tăng hiệu quả bảo vệ khỏi côn trùng và tăng chất lượng hạt cho mục đích làm thức ăn và công nghiệp. Để có thể làm được điều đó, cần thiết phải có một hệ thống chuyển gen có hiệu quả cao, tạo ra một số lượng lớn sự kiện chuyển gen có chất lượng tốt. Đến nay, ngô là loài cây trồng có số lượng sự kiện chuyển gen được USDA thông qua nhiều nhất với 148 sự kiện. Ngô biến đổi gen hiện được trồng tại 16 quốc gia, chiếm 33% tổng diện tích trồng cây chuyển gen trên thế giới (ISAAA, 2016).

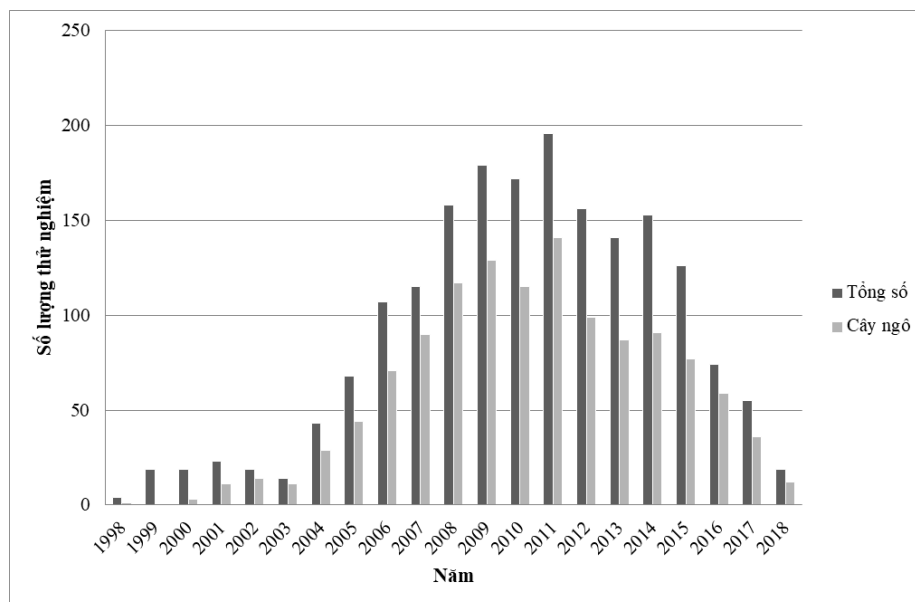
Ở nước ta, việc nghiên cứu cây ngô chuyển gen chịu hạn mới tiến hành một vài năm gần đây như chuyển gen *ZmNF-YB* vào hai dòng ngô VH1 và C8H9 (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2013) hoặc gen *modiCspB* vào ba dòng ngô V152N, C436 và C7N (Huỳnh Thị Thu Huệ *et al.*, 2014). Một số giống ngô chuyển gen từ các công ty đa quốc gia đã được cấp phép đủ điều kiện làm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi ở Việt Nam như NK603, MON89034, Bt11 và MIR162, trong đó các tính trạng được cải biến chủ yếu là kháng sâu hoặc kháng thuốc diệt cỏ. Ngoài ra, giống ngô chuyển gen MON-87460 là giống đầu tiên tăng cường tính chịu hạn đã được cấp phép trồng ở Việt Nam (<http://antoansinhhoc.vn/tra-cuu-gmo-2/>).

### Sự phát triển của cây ngô chuyển gen chịu hạn

Các thử nghiệm trên đồng ruộng đối với các giống cây biến đổi gen chịu hạn bắt đầu từ năm 1998 với số lượng ít và tăng chậm trong 6 năm sau đó. Tuy nhiên, con số này tăng dần từ năm 2005, đạt ổn định tương đối vào giai đoạn 2008-2014 (khoảng 150-200 thử nghiệm mỗi năm). Sau đó, số

lượng các thử nghiệm giảm từ từ, đến năm 2017, chỉ 55 thử nghiệm về cây chuyển gen chịu hạn được cấp phép (Hình 2). Sự thay đổi về số lượng các thử nghiệm trên đồng ruộng phản ánh sự thay đổi về số lượng các nghiên cứu tìm kiếm gen có tiềm năng

chịu hạn và quá trình điều hòa biểu hiện của chúng trong cây chuyển gen. Trong đó, cây ngô có số lượng thử nghiệm trên đồng ruộng cao nhất, trung bình chiếm 66,5% trong tổng số các loài cây trồng (Hình 2).



Hình 2. Số lượng các thử nghiệm trên đồng ruộng các cây biến đổi gen chịu hạn do USDA cấp phép giai đoạn 1998 - 2018 (USDA, 2018).

Tuy vậy, so với các tính trạng khác đã được thử nghiệm trên cây ngô như kháng thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ sâu, tính trạng chịu hạn vẫn còn hạn chế, mặc dù một vài thử nghiệm đã đạt kết quả tích cực. Giống ngô Genuity® DroughtGard™, do Công ty Monsanto sản xuất, được phê duyệt bởi USDA vào tháng 12 năm 2011, chứa gen *CspB* (*cold shock protein B*) có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* là giống ngô chịu hạn đầu tiên. Theo thống kê của ISAAA (James, 2015), diện tích trồng ngô Genuity® DroughtGard™ tăng từ 50.000 ha vào năm 2013 lên 810.000 ha vào năm 2015. Giống ngô biến đổi gen chịu hạn này đã làm giảm thiệt hại đến 6% trong điều kiện hạn vừa so với giống ngô không biến đổi gen (Reeves *et al.*, 2010). Tuy nhiên, trong điều kiện hạn nặng, giống Genuity® DroughtGard™ chưa thể hiện ưu điểm vượt trội so với cây không biến đổi gen (Castiglioni *et al.*, 2008). Tuy nhiên, dù có ý kiến trái chiều về kết quả của các thử nghiệm trên đồng ruộng, Genuity® DroughtGard™ đã mang đến một tính trạng mới và cũng là giống cây biến đổi gen đầu tiên được tạo ra để đương đầu với thách thức biến đổi khí hậu.

## TÍNH TRẠNG CHỊU HẠN VÀ CÁC GEN LIÊN QUAN

### Tính trạng chịu hạn ở thực vật

Cây trồng thích nghi với điều kiện bất lợi thông qua các biến đổi hình thái và sinh lý, là kết quả của việc thay đổi mức độ biểu hiện của các gen cảm ứng với các bất lợi đó. Sản phẩm của các gen này hoặc tham gia bảo vệ tế bào trực tiếp hoặc tham gia truyền tín hiệu và điều hòa sự biểu hiện của các gen khác. Nhóm thứ nhất bao gồm các protein có chức năng bảo vệ tế bào khỏi sự mất nước như các enzyme cần cho sự tổng hợp các chất osmoprotectant, protein late-embryogenesis-abundant (LEA), protein chống đông, chaperones và enzyme khử. Nhóm thứ hai bao gồm các gen mà sản phẩm của nó là các nhân tố phiên mã, protein kinase và các protein trung gian truyền tín hiệu (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Khả năng chịu hạn là một tính trạng phức tạp, do nhiều gen tham gia nên khả năng kiểm soát gặp nhiều khó khăn. Trong khi đó, phương pháp dùng công nghệ gen để tạo cây ngô biến đổi gen chịu hạn

hiện nay thường chỉ dựa vào việc chuyển một hoặc một vài gen tham gia vào quá trình truyền tín hiệu và điều hòa, hoặc mã hóa cho các protein chức năng có liên quan đến sự bảo vệ cấu trúc tế bào. Các gen này có mối liên hệ và tương tác chặt chẽ với các con đường chuyển hóa trong tế bào. Vì vậy, việc lựa chọn gen tiềm năng từ nguồn gen của chính cây ngô, hoặc một loài khác gặp khó khăn. Hơn nữa,

nhiều nghiên cứu di truyền và kết quả lai tạo cũng cho thấy hiệu quả của các gen tham gia tạo nên tính chịu hạn thay đổi trong các môi trường khác nhau (Cattivelli *et al.*, 2008). Đến nay, đã có rất nhiều gen tham gia vào cơ chế chống chịu hạn được nghiên cứu và sử dụng để chuyển vào thực vật, cho thấy sự đầu tư không ngừng cho việc tạo cây trồng chịu hạn (Bảng 1).

**Bảng 1.** Các gen liên quan tính chịu hạn được sử dụng cho chuyển gen.

Chức năng gen	Gen	Protein	Nguồn phân lập gen	Cây nhận gen	Tham khảo	
Các protein kinase	MAPKs	<i>OsMAPK5</i>	MAPK	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Yang, Xiong, 2008
		<i>NPK1</i>	MAPKKK	<i>N. tabacum</i>	<i>O. sativa</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2009
		<i>DSM</i>	MAKKK	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Ning <i>et al.</i> , 2010
	Các protein kinase khác	<i>OsSIK1</i>	Receptor like kinase	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Chen <i>et al.</i> , 2013
		<i>SOS2</i>	Serine/Threonine kinase	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2009
Các nhân tố phiên mã	Ap2 /ERF	<i>DREB1A,-1B, -1C</i>	DREB1/CBF	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	Ito <i>et al.</i> , 2006
		<i>HvCBF4</i>	DREB1/CBF	<i>H. vulgare</i>	<i>O. sativa</i>	Oh <i>et al.</i> , 2007
		<i>OsDREB1F</i>	DREB1/CBF	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008
		<i>OsDREB2A</i>	DREB2	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Cui <i>et al.</i> , 2011
		<i>TaDREB2,-3</i>	DREB	<i>T. aestivum</i>	<i>T. aestivum</i> / <i>H. vulgare</i>	Morran <i>et al.</i> , 2011
	bZIP	<i>OsZIP23</i>	bZIP	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Xiang <i>et al.</i> , 2008
		<i>OsZIP46</i> (constitutive active form)	bZIP	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Tang <i>et al.</i> , 2012
		<i>OsZIP72</i>	bZIP	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Lu <i>et al.</i> , 2009
		<i>SIAREB1</i>	bZIP	<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Orellana <i>et al.</i> , 2010
	NAC	<i>OsNAC9</i>	NAC	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Redillas <i>et al.</i> , 2012
		<i>OsNAC10</i>	NAC	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Jeong <i>et al.</i> , 2010
		<i>OsNAC5</i>	NAC	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Jeong <i>et al.</i> , 2013
		<i>SNAC1</i>	NAC	<i>O. sativa</i>	<i>T. aestivum</i>	Saad <i>et al.</i> , 2013
		<i>TaNAC69</i>	NAC	<i>T. aestivum</i>	<i>T. aestivum</i>	Xue <i>et al.</i> , 2011
	Zinc finger	<i>ZFP252</i>	C2H2 zinc finger	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Xu <i>et al.</i> , 2008
		<i>Zat10</i>	C2H2-EAR zinc finger	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2009
	Các nhân tố phiên mã khác	<i>OsMYB2</i>	MYB	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012
		<i>TaPIMP1</i>	R2R3 MYB	<i>T. aestivum</i>	<i>T. aestivum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012b

		<i>OsWRKY30</i>	WRKY	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Shen <i>et al.</i> , 2012
Protein phân hủy protein		<i>OsDIR1</i>	E3 ubiquitin ligase	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Gao <i>et al.</i> , 2011
		<i>OsRDCP1</i>	E3 ubiquitin ligase	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Bae <i>et al.</i> , 2011
Protein khác		<i>OsSKIPa</i>	Ski-interacing protein	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Hou <i>et al.</i> , 2009
		<i>OSRIP18</i>	Ribosome-inactivating protein	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Jiang <i>et al.</i> , 2012
Chuyển hóa abscisic acid		<i>DSM2</i>	Carotene hydroxylasae	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Du <i>et al.</i> , 2010
		<i>LOS5</i>	Molybdenum cofactor sulfurase	<i>A. thaliana</i>	<i>G. max</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
Chuyển hóa các hormone khác		<i>IPT</i>	Isopentenyltransferase	<i>A. tumefaciens</i>	<i>O. sativa</i>	Peleg <i>et al.</i> , 2009
		<i>IPT</i>	Isopentenyltransferase	<i>A. tumefaciens</i>	<i>G. birsutum</i>	Kuppu <i>et al.</i> , 2013
Protein bảo vệ	Trehalose	<i>OsTPS</i>	Tre alose-6-phosphate synthase	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Li <i>et al.</i> , 2011
		<i>TPSP (otsA+otsB)</i>	Trehalose-6-phosphate synthase	<i>E. coli</i>	<i>O. sativa</i>	Jang <i>et al.</i> , 2003
		<i>OsMads6-Tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase	<i>O. sativa</i>	<i>Z. mays</i>	Nuccio <i>et al.</i> , 2015
	Mannitol	<i>mtlD</i>	Mannitol-1-phosphatw dehydrogenase	<i>E. coli</i>	<i>T. aestivum</i>	Abebe <i>et al.</i> , 2003
		<i>OsLEA3-2</i>	LEA protein	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Duan, Cai, 2012
		<i>HVA1</i>	LEA protein	<i>H. vulgare</i>	<i>O. sativa</i>	Babu <i>et al.</i> , 2004
		<i>OsPIN3t</i>	Auxin efflux carrier	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012
		<i>beta, TsVP</i>	Choline dehydrogenase ( <i>beta</i> ), V-H <sup>+</sup> -Ppase ( <i>TsVP</i> )	<i>E. coli (beta), T. balophila (TsVP)</i>	<i>Z. mays</i>	Wei <i>et al.</i> , 2011
Phản ứng với gốc oxi hóa hoạt động		<i>OsSRO1c</i>	Similar to RCD1	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	You <i>et al.</i> , 2012
Chuyển hóa amino acid		<i>OsOAT</i>	Ornithine- δ-aminotransferase	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	You <i>et al.</i> , 2012
Protein đáp ứng với lạnh đột ngột		<i>CspA /CspB</i>	cold shock proteins	<i>E. coli /B. subtilis</i>	<i>Z. mays</i>	Castiglioni <i>et al.</i> , 2008
Chất điều hòa thẩm thấu		<i>mtlD</i>	mannitol 1-phosphate dehydrogenase	<i>E. coli</i>	<i>Z. mays</i>	Sticklen <i>et al.</i> , 2013
		<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase	<i>E. coli</i>	<i>Z. mays</i>	Lightfoot <i>et al.</i> , 2007
		<i>TPS1, TPS2</i>	trehalose-6-phosphate synthase	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. mays</i>	Jiang <i>et al.</i> , 2010
Protein cảm ứng với muối		<i>SbSI-1/ SbSI-2</i>	Salt-induce proteins	<i>S. brachiata</i>	<i>N. tabacum</i>	Yadav <i>et al.</i> , 2014
Protein nhạy cảm với nồng độ muối cao		<i>SbSOS1</i>	Salt over sensitive proteins	<i>S. brachiata</i>	<i>N. tabacum</i>	Yadav <i>et al.</i> , 2012

### Nhóm gen liên quan nhân tố phiên mã

Nhân tố phiên mã là các protein có vai trò kiểm soát quá trình phiên mã bằng cách bám vào các vùng trình tự đặc hiệu trên promoter của gen. Các nhân tố phiên mã hiện nay được các nhà khoa học tập trung vào nghiên cứu và khai thác do tiềm năng sử dụng lớn trong công nghệ sinh học (Century *et al.*, 2008; Saibo *et al.*, 2009). Các protein này có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của nhiều gen khác và ảnh hưởng lên nhiều khía cạnh của quá trình trao đổi chất ở cây. Nhiều nhân tố phiên mã liên quan đến khả năng chịu hạn đã được phát hiện và nghiên cứu trong nhiều năm qua (Umezawa *et al.*, 2006). Các nhân tố phiên mã này thay đổi mức độ biểu hiện của các gen liên quan phía sau trong con đường đáp ứng với hạn hán, do đó thay đổi các quá trình sinh hóa và phát triển làm tăng khả năng sống sót của cây. Nhiều nhân tố phiên mã đã được xác định là nhân tố phiên mã đáp ứng với hạn gồm WRKY (Rushton *et al.*, 2012), zinc finger (Huang *et al.*, 2009), AP2/ERF2 (Sakuma *et al.*, 2002), MYB (Abe *et al.*, 1997), ZmDREB2A (Qin *et al.*, 2007) và NAC (Tran *et al.*, 2004).

WRKY là họ nhân tố phiên mã lớn nhất, được tìm thấy ở nhiều loài, đặc biệt là ở các thực vật bậc cao (Ulker, Somssich, 2004). Đã từ lâu, WRKY được biết là tham gia trong nhiều đáp ứng của thực vật với các bất lợi sinh học (Hu *et al.*, 2012). Gần đây, các nhà khoa học tập trung vào nghiên cứu vai trò của nhóm nhân tố phiên mã này trong đáp ứng của cây với điều kiện bất lợi phi sinh học, đặc biệt là hạn hán ở *Arabidopsis*, lúa mạch (Xiong *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013). Mới đây, các nhà khoa học đã phân lập được gen *ZmWRKY33* ở ngô và khi biểu hiện gen này trong *Arabidopsis* đã làm tăng khả năng chống chịu muối của cây chuyển gen (Li *et al.*, 2013). Một gen khác trong họ là *ZmWRKY58* cũng cho thấy vai trò tăng khả năng chống chịu hạn và muối ở lúa (Cai *et al.*, 2014).

Protein zinc finger là protein phổ biến nhất ở tế bào nhân thực, chức năng của các protein này khá đa dạng, chúng có khả năng liên kết với DNA và RNA, hoạt hóa phiên mã, điều hòa quá trình chết theo chương trình, điều hòa sự cuộn gấp protein. Nhiều protein zinc finger đã được chứng minh là có khả năng làm tăng khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi. Protein zinc finger Cys2/His2 được chứng minh là được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi khác nhau ở lúa (Agarwal *et al.*, 2007). Sự biểu hiện của gen *ZmZF1* của ngô trong cây mô hình *Arabidopsis* giúp cây có khả năng chịu hạn và muối (Huai *et al.*, 2009). Cùng với đó, họ gen zinc finger loại CCCH

đã được phân tích ở ngô và cho thấy có sự biểu hiện mạnh ở nhóm gen này khi cây gặp hạn hoặc cảm ứng ABA (Peng *et al.*, 2012). Gần đây, người ta phân lập được hai gen *ZmZnF1* và *ZmZnF2* từ hạt ngô trong điều kiện mất nước. Các thí nghiệm đã cho thấy hai gen trên là gen nhân tố phiên mã và có thể có vai trò trong đáp ứng của cây khi gặp hạn (Yu *et al.*, 2015).

Nhân tố phiên mã đáp ứng với bất lợi tốt nhất là protein C-repeat-binding factor (CBF)/dehydration-responsive element-binding (DREB) thuộc họ protein AP2/ethylene-responsive element-binding (Maruyama *et al.*, 2004). Các nhân tố này tăng cường hoặc thay đổi sự biểu hiện của gen với hộp CBF/DRE trên promoter của các gen đó (motif CCGAC) và tạo ra con đường đáp ứng stress không phụ thuộc ABA. Mặc dù khi tăng biểu hiện protein CBF/DREB làm tăng khả năng chịu hạn ở nhiều loài (Zhang *et al.*, 2004), người ta cũng quan sát thấy nhiều sự thay đổi bất thường về kiểu hình, ví dụ sinh trưởng còi cọc. Tuy nhiên, sử dụng promoter cảm ứng với hạn hán để biểu hiện CBF/DREB chỉ khi cây gặp bất lợi đã giải quyết phần nào sự bất thường trong kiểu hình của cây chuyển gen. CBF1/DREB1B (Kasuga *et al.*, 1999), CBF3/DREB1A (Gilmour *et al.*, 2000), CBF4 (Haake *et al.*, 2002) đều đã được chứng minh là có khả năng làm tăng khả năng sử dụng nước hiệu quả và tăng tính chịu hạn ở các cây chuyển gen trong phòng thí nghiệm.

Họ nhân tố phiên mã bZIP và MYB là hai họ lớn tham gia con đường đáp ứng phụ thuộc ABA. Nhiều gen cảm ứng bởi ABA mang trình tự liên ứng (C/T)ACGTGGC, yếu tố đáp ứng ABA (ABRE) trong vùng promoter của chúng (Mundy *et al.*, 1990). Nhân tố phiên mã *ZmbZIP72* của ngô đã được phân lập và biểu hiện trong *Arabidopsis* cho thấy làm tăng khả năng chịu hạn và muối. Đồng thời, sự tăng cường biểu hiện của gen *ZmbZIP72* cũng làm tăng sự biểu hiện của các gen cảm ứng bởi ABA khác như RD29B, RAB18 và HIS1-3 (Ying *et al.*, 2012).

Các nhân tố phiên mã NAC chỉ có ở thực vật, mặc dù nó có vai trò thiết yếu trong việc điều hòa các quá trình sinh học riêng biệt, các nhân tố này chưa được nghiên cứu nhiều ở ngô. Họ gen *ZmNAC* ở ngô gồm 6 nhóm với các motif bảo thủ riêng. Trong số 152 gen *ZmNAC*, 24 gen được cho là có đáp ứng với bất lợi đều thuộc nhóm II, 11 gen đã được chứng minh là được biểu hiện mạnh khi cây gặp hạn (Shiriga *et al.*, 2014). Do đó, nhóm gen này hiện nay cũng đang là đối tượng nghiên cứu để áp dụng làm tăng tính chịu hạn cho cây ngô.



### Nhóm gen mã hóa protein truyền tín hiệu

Khi gặp điều kiện bất lợi, cây tiếp nhận tín hiệu, xử lý và truyền tín hiệu nhờ hệ thống gồm các enzyme kinase, enzyme chuyển hóa phospholipid, calcium sensing, v.v... Mặc dù các quá trình truyền tín hiệu này khá phức tạp và chưa được hiểu rõ, một vài gen mã hóa cho các yếu tố tham gia trong đáp ứng chịu hạn đã được phân lập. Các gen đã được sử dụng gần đây để tạo tính chịu hạn cho cây gồm: *NPK1* (Kovtun *et al.*, 2000), *SnRK2* (Umezawa *et al.*, 2004), *CBL* (Cheong *et al.*, 2003). Cũng giống như nhân tố phiên mã, việc biến đổi một yếu tố truyền tín hiệu có thể ảnh hưởng đến nhiều gen sau đó, kết quả là tăng khả năng chống chịu do nhiều thay đổi khác nhau. Ví dụ, gen *NPK1* mã hóa cho MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase) của thuốc lá. Enzyme kinase này nằm ở giai đoạn đầu của con đường truyền tín hiệu oxi hóa và khi tăng cường biểu hiện ở cây ngô đã dẫn đến khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi như lạnh, nóng, hạn và mặn cho cây ngô chuyển gen (Shou *et al.*, 2004). Hoạt hóa các gen hạn này có thể bảo vệ bộ máy quang hợp của cây khỏi tổn thương do hạn, đó đó tăng năng suất. Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase (PIS) là một enzyme quan trọng trong con đường tổng hợp phospholipid và xúc tác sự hình thành phosphatidylinositol. Phosphatidylinositol không những là một thành phần cấu trúc màng tế bào mà còn là tiền chất của phân tử tín hiệu điều hòa đáp ứng của cây trước điều kiện bất lợi. Khi tăng cường biểu hiện gen *ZmPIS* trong cây ngô chuyển gen, cây chịu hạn tốt hơn, đặc biệt là giai đoạn trước khi ra hoa (Liu *et al.*, 2013). Nguyên nhân là do *ZmPIS* điều hòa đáp ứng của cây trước yếu tố bất lợi nhờ việc thay đổi thành phần màng lipid và làm tăng sự tổng hợp ABA trong cây. Calcium-dependent protein kinases (CDPK) có vai trò thiết yếu trong con đường truyền tín hiệu qua Ca. Nhiều thành viên của họ kinase này đã được biết đến là chất điều hòa của cây khi đáp ứng với con đường tín hiệu phụ thuộc ABA. Sự biểu hiện của gen *ZmCPK4* (Jiang *et al.*, 2013) và *ZmCPK12* (Wang, Song, 2013) ở *Arabidopsis* cho thấy hạt nảy mầm nhạy với ABA, và cây chuyển gen có khả năng chịu hạn.

Một lợi thế khác của việc sử dụng các yếu tố truyền tín hiệu đó các yếu tố này có thể được hoạt hóa hoặc bất hoạt để đáp ứng với các điều kiện stress khác nhau. Ví dụ *SnRK2* (SNF1-related protein kinase) đáp ứng tích cực với sự thiếu nước, quá trình trưởng thành và nảy mầm của hạt (Fujii *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009). Các protein *SnRK2* sau khi

được hoạt hóa bởi ABA và các bất lợi về thâm thấu sẽ phosphoryl hóa các ABF (nhân tố liên kết với yếu tố đáp ứng ABA) (Halford, Hey, 2009), ví dụ các yếu tố phiên mã và dẫn đến sự biểu hiện của các gen đáp ứng với điều kiện khô hạn. *ZmMKK1* (maize mitogen-activated protein kinase kinase) cũng là một kinase tương tự như *NPK1*, có vai trò làm tăng sự biểu hiện của các enzyme xử lý các gốc oxi hóa và các gen liên quan đến ABA như *POD*, *CAT*, *RAB18*, *RD29A* (Cai *et al.*, 2014). Cây *Arabidopsis* biểu hiện mạnh gen *ZmMKK1* cho thấy tăng khả năng chống chịu với mặn và hạn.

### Nhóm gen mã hóa protein chức năng

Họ protein LEA là một họ protein cảm ứng với các điều kiện bất lợi quan trọng trong tế bào thực vật (Umezawa *et al.*, 2006). Vai trò bảo vệ của nhóm protein này bao gồm chống lạnh, chống bất lợi thâm thấu để làm ổn định màng và các protein khác. Protein nhóm LEA có khả năng ưa nước cao, những đoạn lặp amino acid ngắn thường được tìm thấy trong nhóm protein này. Protein LEA cũng được chú ý trong điều kiện thiếu nước (Goyal *et al.*, 2005). Bên cạnh dữ liệu phong phú về cấu trúc và sự biểu hiện của nhóm protein này, ngày càng nhiều các công trình đề cập đến việc sử dụng các gen LEA nhằm cải thiện khả năng chịu hạn của cây trồng (Xiao *et al.*, 2000; Grelet *et al.*, 2005). Ví dụ, gen *HVA1* mã hóa cho protein LEA3 của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.), đã được chuyển thành công vào cây ngô và tạo ra cây tăng cường tính trạng chịu hạn và mặn trong điều kiện nhà lưới (Nguyen *et al.*, 2013). Li và Cao (2016) đã phân tích và so sánh họ gen *LEA* ở ngô, bao gồm các thông tin về quan hệ phát sinh chủng loại, vị trí trên nhiễm sắc thể, sự phát sinh gen, cấu trúc và sự biểu hiện của gen. Ở ngô, 32 gen *LEA* phân bố đều trên 10 nhiễm sắc thể và mã hóa cho các protein LEA thuộc chín nhóm. Hiện tượng chuyển vị, lặp đoạn và lặp đoạn nối tiếp đã góp phần mở rộng họ gen *LEA* (Li, Cao, 2016).

Sự tồn tại của thực vật dưới điều kiện bất lợi phụ thuộc rất nhiều vào hệ thống chống lại các chất gây oxi hóa trong tế bào, giúp bảo vệ màng tế bào và các bào quan khỏi bị phá hủy bởi các gốc oxi hóa tự do. Các protein trong hệ thống bao gồm superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), catalase (CAT), protein shock nhiệt (HSP) (Li *et al.*, 2003), glutathione S-transferase (GSTs) (Roxas *et al.*, 1997). Sự tích lũy đồng thời hai protein HSP và GSTs có thể giảm thiệt hại gây ra bởi lạnh, nóng, hạn và bảo vệ cây khỏi các bất lợi khác của môi trường (Li *et al.*, 2013).

Ngoài ra, dưới điều kiện khô hạn hoặc các thay đổi về áp suất thẩm thấu ngoài môi trường, cây thường tích lũy các chất có vai trò duy trì sức trương của tế bào, gồm amino acid (ví dụ, proline), quaternary amine (glycine betaine, dimethylsulfoniopropionate) và polyol/sugars (mannitol, trehalose). Năm 2004, Quan và đồng tác giả đã chuyển gen mã hóa cho choline dehydrogenase, có vai trò trong việc tổng hợp glycine betain (*betA*) từ *E. coli* vào ngô. Cây ngô chuyển gen *betA* có nồng độ glycine betain tích lũy cao và chịu hạn tốt hơn so với cây đối chứng ở cả giai đoạn này mầm và cây nhỏ. Gần đây, Nuccio và đồng tác giả (2015) đã biểu hiện gen mã hóa cho trehalose-6-phosphate phosphatase trong cây ngô, dẫn đến giảm nồng độ của trehalose-6-phosphate và tăng nồng độ đường sucrose trong hạt ngô. Điều này làm tăng sản lượng ngô 9 - 49% ở điều kiện không hạn hoặc hạn vừa và 31 - 123% ở điều kiện hạn nặng so với cây ngô không được chuyển gen.

## CÁC YẾU TỐ GẮN LIỀN VỚI GEN KHI TẠO CÂY CHUYỂN GEN

### Vector chuyển gen

Vector chuyển gen được sử dụng trong công nghệ gen và công nghệ chuyển gen thực vật được kế thừa và phát triển từ các hệ vector tách dòng và biểu hiện ở vi khuẩn hoặc virus gây bệnh ở thực vật. Tùy thuộc vào phương pháp chuyển gen mà các nhà khoa

học chọn loại vector cho phù hợp. Đối với phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen, vector được sử dụng khá đơn giản, không yêu cầu các trình tự phức tạp. Thực tế là phương pháp sử dụng súng bắn gen có thể chuyển bất kì đoạn DNA nào với kích thước, trình tự và cấu hình bất kì nhưng nhược điểm là thường đưa khá nhiều bản sao của gen chuyển vào hệ gen cây nhận (Alpeter *et al.*, 2005). Trong khi đó, chuyển gen bằng phương pháp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* đòi hỏi vector có thêm nhiều các trình tự khác để hỗ trợ việc chuyển đoạn T-DNA vào hệ gen của cây. Vector liên hợp là một plasmid chứa đầy đủ các trình tự cần thiết và đoạn T-DNA để có thể chuyển gen vào cây. Tuy nhiên, kích thước của plasmid khá lớn, đồng thời việc tạo plasmid này là do sự tái tổ hợp trong vi khuẩn nên dần dần hệ vector này ít được sử dụng. Thay vào đó, hệ vector hai nguồn mang lại nhiều lợi thế hơn. Hệ vector hai nguồn gồm hai plasmid, một plasmid trợ giúp mang các trình tự cần thiết cho quá trình chuyển gen từ vi khuẩn và cây, và một T-DNA plasmid mang đoạn gen cần chuyển. Plasmid trợ giúp có sẵn trong vi khuẩn *Agrobacterium* và bị loại bỏ các trình tự liên quan đến sự tạo khối u ở cây (Bảng 2). Trong khi đó, plasmid mang đoạn T-DNA thường nhỏ hơn chứa gen chỉ thị, vùng T-DNA và chứa các trình tự thông thường cho phép plasmid nhân lên trong *E. coli* và *Agrobacterium tumefaciens*. Hiện nay, nhiều hệ plasmid hai nguồn đã được sử dụng với các đặc trưng khác nhau, phục vụ cho các mục đích thí nghiệm thích hợp (Bảng 3).

**Bảng 2.** Một số chủng *Agrobacterium* thường dùng.

Tên chủng	Hệ NST	Plasmid trợ giúp	Kháng kháng sinh
AGL-0	C58	pTiBo542	rif
AGL-1	C58	pTiBo542	rif, carb
C58-Z707	C58	pTiC58	kan
EHA101	C58	pTiBo542	rif, kan
EHA 105	C58	pTiBo542	rif
GV3101::pMP90	C58	pTiC58	rif, gent
LBA4404	Ach5	pTiAch5	rif
NT1 (pKPSF2)	C58	pTiChry5	ery

Rif: rifampicin; Kan: kanamycin; Carb: carbenicillin, Ery: erythromycin (Lee *et al.*, 2008).

**Bảng 3.** Các T-DNA plasmid thuộc hệ vector hai nguồn (Theo (Murai, 2013).

Tên T-DNA plasmid	Năm	Kích thước (kb)	TT khởi đầu tái bản trong <i>E. coli</i>	Nguồn gốc hai trình tự biên (LB/RB)	Kháng sinh sử dụng để chọn lọc ở vi khuẩn	Cấu trúc gen chọn lọc ở thực vật
<b>Nhóm có trình tự khởi đầu tái bản là IncP-1/pRK2</b>						
<b>Các vector hai nguồn dựa vào pRK252 (10,3kb)</b>						
pBin19	1984	11,8	pRK2	nop pTiT37	kan NPTIII	nos:NPTII:nos phía RB
pAGS127	1985	15,0	pRK2	oct pTiA6/Ach5	tet	nos:NPTII:ocs phía RB
pBI121	1987	14,7	pRK2	nop pTiT37	kan NPTIII	nos:NPTII:nos phía RB
pBIG	1990	13,9	pRK2	nop pTiT37	kan NPTIII	nos:NPTIII/HPT:G7 phía RB
<b>Các vector hai nguồn dựa vào pRK290 (20,0kb)</b>						
pOCA18	1988	24,3	pRK2	oct pTi	tet	nos:NPTII:ocs phía LB
pJJ1881	1992	25,7	pRK2	oct pTiA6/Ach5	tet	nos:NPTII/HPT:ocs phía LB
<b>Các vector dựa vào pTJS75 (7,0kb)</b>						
pGA471	1985	15,6	pBR322	nop pTiT37	tet	nos:NPTII:nos phía RB
pTRA409	1991	11,5	pRK2	oct pTi15955	tet	tml:NPTII:tml phía RB
<b>Các vector hai nguồn dựa vào RK2</b>						
pPCV001	1986	9,2	pBR322	pTiC58/B6S3	amp/chl	nos:NPTII:ocs phía RB
pCB301	1999	5,0	pRK2	nop pTiT37	kan NPTIII	nos:BAR:nos phía LB
<b>Nhóm pRIHRI và có trình tự khởi đầu tái bản là CoIEI</b>						
pC22	1986	17,5	pBR322	oct pTiB6S3	amp/str/spc	nos:NPTII:nos phía RB
pCGN1547	1990	14,4	pBR322	oct pTiA6	gent pPH1JI	mas/35S:NPTII:mas/tml phía LB
<b>Nhóm có trình tự khởi đầu tái bản là IncR/pSa</b>						
pGreen0029	2000	4,6	pSa	nop pTiT37	kan NPTI	nos:NPTII:nos phía RB
pSoup	2000	9,3	pRK2	không	tet	Không
pCLEAN-G115	2007	6,0	pSa	nop pTi cons	kan NPTI	35S:HPT:nos phía LB
pCLEAN-S166	2007	11,1	pSa	nop pTi cons	tet	nos:HPT:nos phía LB
<b>Nhóm có trình tự khởi đầu tái bản là IncP/pVS1 và CoIEI</b>						
pPZP111	1994	11,8	pBR322	nop pTiT37	chl	35S:NPTIII/aacC1:35S phía LB
pPZP211	1994	11,9	pBR322	nop pTiT37	str/spc	35S:NPTIII/aacC1:35S phía LB
pCAMBIA	1995	11,5	pBR322	nop pTiT37	kan NPTIII	35S:NPTIII/HPT:35S phía LB
pLSU2	2011	6,4	pUC18	oct pTi15955	kan NPTI	tml:NPTIII/HPT:tml phía LB
pLSU12	2011	6,9	pUC18	oct pTi15955	tet	tml:NPTIII/HPT:tml phía LB

Việc thiết kế vector chuyển gen là cần thiết để đảm bảo tạo ra được các sự kiện chuyển gen hiệu quả và chính xác cũng như khả năng biểu hiện của các gen được chuyển trong cây biến đổi gen. Mức độ biểu hiện của gen được chuyển là yếu tố quyết định đến tính trạng mà gen đó quy định. Nếu gen được chuyển có mức độ biểu hiện thấp, tính trạng mà gen đó mang lại không cho kết quả như mong đợi. Mức độ biểu hiện gen được chuyển quá cao, trong khi đó lại ảnh hưởng đến sự phát triển của cây. Do đó, gen quy định tính trạng quan tâm cũng như vùng T-DNA cần được thiết kế sao cho tối ưu nhất. Các khung đọc mở không mong muốn, các trình tự mã hóa cho protein giống hoặc tương tự như các chất gây độc hoặc gây chết cho cây cần được loại bỏ (Ladies *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 2012). Các gen quy định tính trạng mong muốn cần có các trình tự điều hòa tối ưu như promoter, trình tự Kozak, các vùng không dịch mã. Việc tối ưu hóa mã cũng cần thiết nếu gen được phân lập từ một loài khác. Vị trí của gen chuyển trong T-DNA cũng ảnh hưởng đến chất lượng của sự kiện chuyển gen. Thông thường gen quan tâm được đặt ở vị trí gần bờ phải hơn của T-DNA hơn so với gen chọn lọc, điều này giúp gen khi chuyển vào cây được bảo toàn hơn. Vị trí chèn T-DNA vào trong hệ gen thực vật cũng ảnh hưởng tới mức độ biểu hiện do các yếu tố điều hòa ở gần đó có thể hoạt hóa hoặc bất hoạt gen (De Buck *et al.*, 2013). Nếu có thể, một vài trình tự ngăn cách có thể được thêm vào để giảm thiểu sự can thiệp của các trình tự nội tại gần vị trí chèn gen (Singer *et al.*, 2011).

### Promoter

Promoter là yếu tố quan trọng nhất trong việc điều hòa biểu hiện gen. Các promoter có thể được chia thành 3 nhóm gồm: promoter cơ định, promoter đặc hiệu mô và promoter cảm ứng. Promoter cơ định khiến gen biểu hiện liên tục ở tất cả các mô và trong tất cả các giai đoạn phát triển. Promoter đặc hiệu mô sẽ biểu hiện gen chỉ ở loại mô nhất định. Promoter cảm ứng chỉ biểu hiện gen dưới một điều kiện nhất định như ánh sáng, nhiệt độ, nồng độ dinh dưỡng, hoặc khi đáp ứng với việc sử dụng một chất hóa học nào đó. Bảng 4 chỉ ra các loại promoter đang được sử dụng trong công nghệ gen (Dutt *et al.*, 2014).

Giai đoạn đầu trong tạo cây biến đổi gen, promoter cơ định được ưa chuộng và sử dụng cho hầu hết các nghiên cứu ở các loài khác nhau. Promoter được sử dụng nhiều nhất vào thời điểm đó là CaMV35S từ virus khảm súp lơ (cauliflower mosaic virus) với các cải biến khác nhau để tăng cường hoạt động của promoter trong cây một lá mầm

(Vain *et al.*, 1996; Frame *et al.*, 2002). Cho đến nay, promoter CaMV35S và Ubi1 là hai promoter mạnh và được sử dụng phổ biến trong các thí nghiệm chuyển gen vào cây ngô. Promoter cơ định có lợi thế khi sử dụng cho các gen sàng lọc hoặc gen chỉ thị, bởi vì quá trình sàng lọc yêu cầu các gen này biểu hiện ngay khi sát nhập vào hệ gen của cây. Điều này cho phép chọn lọc được các cá thể mang gen chuyển hiệu quả và giảm tỉ lệ dương tính giả. Trong khi đó, promoter đặc hiệu có ưu thế biểu hiện gen chuyển mạnh chỉ ở một mô nhất định giúp cây không bị lãng phí dinh dưỡng và năng lượng. Đặc biệt, khi protein được biểu hiện cần được tách chiết thì việc tập trung protein ở một mô nhất định như ở hạt giúp các quá trình được dễ dàng hơn (Hood *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005). Promoter cảm ứng cũng đem lại những lợi thế tương tự như promoter đặc hiệu mô. Tuy nhiên, promoter cảm ứng có lợi thế hơn khi có thể kiểm soát được thời gian và cường độ biểu hiện của gen. Hiện nay, các promoter cảm ứng với các chất hóa học đã được dùng với mục đích thu protein tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào (Huang *et al.*, 2005). Promoter cảm ứng với các điều kiện môi trường dù mới được quan tâm nhưng đã cho thấy tiềm năng trong việc tạo ra các tính trạng giúp cây đương đầu với các bất lợi phi sinh học mà không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây trong điều kiện bình thường (Xiao *et al.*, 2000; Cominelli *et al.*, 2008; Msanne *et al.*, 2011).

Vị trí và thời điểm các gen mã hóa cho các protein tham gia vào khả năng chống chịu như nhân tố phiên mã, protein truyền tín hiệu hay protein bảo vệ mang tính quyết định đến sự biểu hiện của tính trạng và sự sinh trưởng của cây. Nhiều báo cáo đã cho thấy gen được biểu hiện liên tục dưới promoter CaMV35S gây ảnh hưởng đến hình thái và sinh trưởng của cây biến đổi gen (Hsieh *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2007). Do đó, việc sử dụng promoter cảm ứng là giải pháp cho phép biểu hiện gen chuyển vào thời gian thích hợp. Ví dụ, gen mã hóa cho nhân tố phiên mã *DREB1/CBF3* được biểu hiện khi cây gặp bất lợi về thâm thấu, nhưng lại bất hoạt trong các điều kiện bình thường. Nếu promoter cảm ứng RD29A được sử dụng khi chuyển các gen nhân tố phiên mã thì hiện tượng sinh trưởng không bình thường sẽ không xảy ra đối với cây chuyển gen mà vẫn cho khả năng chống chịu trong điều kiện bất lợi (Kasuga *et al.*, 1999). Tương tự ở cà chua, khả năng chịu hạn và lạnh tăng lên khi cây được chuyển gen *CBF1* (một nhân tố phiên mã thuộc họ AP2/ERF). Tuy nhiên, nếu sử dụng promoter cơ định thì sinh trưởng của cây bị ảnh hưởng nghiêm trọng (Hsieh *et al.*, 2002), trong khi promoter cảm ứng tổng hợp từ gen *HVA2* lại không cho thấy bất kì sự sinh trưởng bất thường nào (Lee *et al.*, 2003).

**Bảng 4.** Các promoter được sử dụng trong công nghệ gen thực vật.

Promoter	Nguồn gốc, ghi chú
<b>Promoter cơ định</b>	
CaMV35S (cauliflower mosaic virus 35S) promoter	Virus khảm súp lơ
nos (nopaline synthase) promoter	
ocs (octopine synthase) promoter	Ti-plasmid, vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>
mas (mannopine synthase) promoter	
Act1 (actin) promoter	Lúa
Adh1 (alcohol 12 dehydrogenase 1) promoter	
Ubi1 (ubiquitin) promoter	Ngô
Ubi2 (ubiquitin) promoter	
H2B (histone) promoter	
ScBV (sugarcane bacilliform badnavirus) promoter	Mía
Act2 (actin) promoter	<i>Arabidopsis</i>
<b>Promoter cảm ứng</b>	
PR-1a (systematic acquired resistance gene) promoter	Lúa, cảm ứng bởi benzothiadiazole
In2-2 (inducible gene 2-2) promoter	Ngô, cảm ứng bởi benzenesulfonamide safeners
peroxidase promoter	Khoai lang, cảm ứng bởi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , vết thương và tia cực tím
Wound-inducible promoter / MeGA-PharM	Cà chua, cảm ứng bởi vết thương
RD29A promoter	<i>Arabidopsis</i> , cảm ứng với lạnh và bất lợi thẩm thấu
HSP (heat shock protein) promoter	Cà chua, cảm ứng với nhiệt
adh promoter	<i>Arabidopsis</i> , cảm ứng với mất nước và lạnh
HVADhn45 promoter	Lúa mạch, cảm ứng với hạn
<b>Promoter đặc hiệu mô</b>	
<b>Đặc hiệu ở quả</b>	
ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase) promoter	Táo
E8 promoter	Cà chua
<b>Đặc hiệu ở hạt</b>	
Soybean b-conglycinin promoter	Đậu tương, đặc hiệu phôi
Sunflower helianthinin promoter	Hướng dương, đặc hiệu hạt
French bean b-phaseolin promoter	Đậu tây, đặc hiệu hạt
gbss1 (granule-bound starch synthase1) promoter	Lúa, đặc hiệu hạt
Hordein promoter	Barley, đặc hiệu nội nhũ
Glutenin promoter	Lúa mì, đặc hiệu nội nhũ
Zein promoter	Ngô, đặc hiệu nội nhũ
<b>Đặc hiệu ở hoa</b>	
UEP1 (endogenous ubiquitin extension protein) promoter	Cúc
CER6 (eceriferum) promoter	<i>Arabidopsis</i>
EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) promoter	Petunia
<b>Đặc hiệu ở thân</b>	
4CL1 promoter	Bạch đàn
Rice sucrose synthase 1 promoter	Lúa
PAL2 promoter	Đậu tương
<b>Đặc hiệu ở rễ</b>	
RB7	Thuốc lá
Sporamin promoter	Khoai lang

### Các vùng không dịch mã

Bên cạnh promoter, các vùng không dịch mã ảnh hưởng không nhỏ đến sự ổn định của mRNA và quá trình dịch mã, do đó vùng không dịch mã có chức năng trong việc điều hòa mức độ biểu hiện của gen. Người ta cho rằng, chức năng của vùng 5'UTR (untranslated region) là ảnh hưởng đến khả năng bám của ribosome và nhận biết mã mở đầu. Thông thường vùng 5'UTR giàu AT sẽ cho phép phức hệ ribosome dễ dàng di chuyển và nhận ra mã mở đầu để bắt đầu dịch mã. Vùng 5'UTR từ CaMV35S được sử dụng cùng với promoter của nó có thể làm tăng sự biểu hiện của gen báo cáo lên 40 lần (Rothstein *et al.*, 1987). Vùng 5'UTR từ gen glutelin (Boronat *et al.*, 1986) và PEP-carboxylase (Hudspeth, Grula, 1989) cũng cho kết quả là tăng mức độ biểu hiện lên 12 và 3,7 lần. Vùng trình tự nằm xung quanh codon mở đầu cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất dịch mã. Kozak (1986) đã so sánh các mRNA ở động vật có vú và tìm ra được trình tự tối ưu xung quanh mã mở đầu ở các loài động vật có vú là GCC(A/G)CCAUGG, gọi là trình tự liên ứng Kozak.

Trình tự liên ứng bảo thủ tương tự cũng tìm thấy ở gen của các loài thực vật UAACAAUGGCU (Joshi, 1987; Lutcke *et al.*, 1987). Ở ngô, khi so sánh 85 gen ngô tìm thấy trình tự liên ứng là C/GAUGGCG (Lueharsen, Walbot, 1994). Các trình tự liên ứng này cần được cân nhắc khi tạo cấu trúc gen được sử dụng trong ngô.

Vùng 3'UTR cũng được cho là có liên quan đến sự ổn định của mRNA và sự hình thành đuôi polyA. Ảnh hưởng của 3'UTR từ các gen khác nhau đến mức độ biểu hiện gen là khác nhau (Ingelbrecht *et al.*, 1989). Vùng 3'UTR được sử dụng nhiều cho các gen chuyển vào thực vật, trong đó có ngô là từ gen *nopaline synthase (nos)* của Ti-plasmid trong *Agrobacterium* (Depicker *et al.*, 1982). Ngoài ra còn có các vùng 3'UTR từ CaMV35S (Frame *et al.*, 2002), gen *pinII* từ khoai tây (An *et al.*, 1989) và gen protein dự trữ trong thân lá đậu tương (Mason *et al.*, 1993). Hiện nay, vẫn chưa có so sánh nào về sự khác nhau ảnh hưởng của 3'UTR lên sự biểu hiện của gen trong cây ngô chuyển gen được công bố.

**Bảng 5.** Tần suất sử dụng các mã bộ ba ở cây ngô.

Amino acid	Mã bộ ba	Tần suất	Amino acid	Mã bộ ba	Tần suất	Amino acid	Mã bộ ba	Tần suất
Ala	GCU	2,11	Gly	GGA	1,33	Ser	TCC	1,62
Ala	GCC	3,12	Gly	GGG	1,53	Ser	TCT	1,21
Ala	GCA	1,67	His	CAC	1,48	Ser	AGC	1,61
Ala	GCG	2,31	His	CAT	1,01	Ser	AGT	0,78
Arg	AGG	1,48	Ile	ATC	2,30	Ser	TCG	1,05
Arg	CGC	1,43	Ile	ATT	1,40	Ser	TCA	1,12
Arg	AGA	0,88	Ile	ATA	0,84	Thr	ACC	1,65
Arg	CGT	0,61	Leu	CTC	2,55	Thr	ACT	1,08
Arg	CGG	0,94	Leu	TTG	1,32	Thr	ACA	1,05
Arg	CGA	0,43	Leu	CTT	1,59	Thr	ACG	1,08
Asn	AAC	2,22	Leu	TTA	0,57	Trp	TGG	1,29
Asn	AAT	1,35	Leu	CTG	2,58	Tyr	TAC	1,93
Asp	GAC	3,22	Leu	CTA	0,73	Tyr	TAT	0,94
Asp	GAT	2,30	Lys	AAG	3,96	Val	GTC	2,11
Cys	TGC	1,21	Lys	AAA	1,50	Val	GTG	2,56
Cys	TGT	0,56	Met	ATG	2,41	Val	GTT	1,58
Gln	CAA	1,33	Phe	TTC	2,51	Val	GTA	0,63
Gln	CAG	2,35	Phe	TTT	1,26	Ter	TGA	0,11
Glu	GAG	4,09	Pro	CCA	1,39	Ter	TAA	0,05
Glu	GAA	2,00	Pro	CCT	1,26	Ter	TAG	0,07
Gly	GGT	1,43	Pro	CCC	1,35			
Gly	GGC	3,02	Pro	CCG	1,54			

### Tần suất sử dụng các mã bộ ba

Tần suất sử dụng các mã bộ ba cũng là một trong các trở ngại chính làm cho việc biểu hiện các gen vi khuẩn trong cây. Các loài sinh vật khác nhau thường có khuynh hướng sử dụng một mã bộ ba nhiều hơn các mã bộ ba còn lại cùng mã hóa cho một amino acid. Tần suất sử dụng các mã bộ ba ở ngô thể hiện ở bảng 5. Nhiều bộ ba được sử dụng với tần suất cao trong ngô lại là bộ ba hiếm ở vi khuẩn và ngược lại. Bên cạnh tần suất sử dụng các mã bộ ba, một vài đặc trưng đặc biệt trong các trình tự mã hóa của gen thực vật cũng cần được chú ý. Ở thực vật, thành phần GC trong gen có tỷ lệ cao hơn, đặc biệt ở ngô, các vùng mã hóa cho thấy tỷ lệ GC khá cao. Các trình tự 2 nucleotide như CG và AT rất hiếm trong gen thực vật, trong khi CT và TG lại rất hay gặp (Murray *et al.*, 1989). Gen vi khuẩn giàu các đoạn AT, nhưng trong thực vật các đoạn giàu AT thường có chức năng như vùng cắt nối luân phiên, trình tự tín hiệu tạo đuôi polyA (Diehn *et al.*, 1998), và các yếu tố gây bất ổn định RNA (Ohme-Takagi *et al.*, 1993). Vì vậy, sự hiện diện của các trình tự ngắn này trong tế bào thực vật, cùng với tần suất sử dụng mã khác nhau, có thể khiến các gen vi khuẩn khó biểu hiện ở trong tế bào thực vật.

Sử dụng các trình tự mã hóa được tổng hợp là một cách hiệu quả để giải quyết vấn đề này. Nhờ đó, có thể chuyển đổi codon được sử dụng nhiều, tăng thành phần GC, loại bỏ các trình tự gây bất ổn mRNA. Gen tổng hợp đầu tiên được biểu hiện thành công trong cây ngô chuyển gen là gen *cryIA(b)* (Geiser *et al.*, 1986). Vùng mã hóa của 648 amino acid đầu tiên trong số 1155 amino acid của protein CryIA(b) được tổng hợp dựa trên tần suất sử dụng codon phổ biến ở ngô (Kozziel *et al.*, 1993). Gen tổng hợp này có 65% tương đồng với gen ban đầu của nó, thành phần GC được cải biến từ 37% lên 65%. Gen tổng hợp nhân tạo có lượng sản phẩm protein rất cao, trong khi sản phẩm của gen ban đầu gần như không có. Chính nhờ sự thành công trong việc sử dụng gen tổng hợp để biểu hiện protein vi khuẩn trong cây chuyển gen, quá trình tổng hợp và xây dựng lại gen đã trở thành một trong những công việc phổ biến trong các chương trình tạo cây trồng biến đổi gen.

### Tín hiệu đích cho protein

Vị trí protein được tích lũy và thực hiện chức năng là một trong các yếu tố quyết định hiệu quả của protein được biểu hiện. Các bào quan chứa protein có thể ảnh hưởng mạnh mẽ đến các quá trình liên quan như cuộn gấp, lắp ráp và các quá trình biến đổi

sau dịch mã của nó. Đồng thời, việc biểu hiện một protein tham gia vào quá trình chuyển hóa cần phải đưa protein đó vào nơi có cơ chất. Chính vì vậy, để thu được tính trạng mong muốn trong cây chuyển gen, cũng cần chú ý đến đích của protein được tạo ra. Ở thực vật, protein sẽ được đưa vào mạng lưới nội chất nếu mang một trình tự tín hiệu gồm 20 amino acid, thông thường nằm ở đầu N của protein. Nếu không có các tín hiệu định hướng khác, protein sẽ được đưa vào con đường tiết. Đích đến mặc định của con đường tiết là khoảng gian bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào (Denecke *et al.*, 1990). Cơ chế để protein được đưa vào lưới nội chất được nghiên cứu khá tỉ mỉ và cho thấy có sự bảo toàn trong tiến hóa ở động vật và thực vật. Motif gồm 4 amino acid như KDEL, HDEL, nằm ở vùng đầu C của protein là cần thiết để đưa protein vào lưới nội chất hoặc ít nhất được quay lại lưới nội chất. Nhiều protein được vận chuyển đến lưới nội chất bằng việc gắn thêm trình tự KDEL hoặc HDEL đã được công bố và cho thấy nồng độ tích lũy tương đối cao (Schouten *et al.*, 1996). Hoặc motif MAPKKKRV- SV40 định hướng protein vào nhân cũng đã được nghiên cứu và sử dụng khá nhiều, hiện nay còn được dùng để hướng đích khi dùng phức hệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trong ngô (Svitashev *et al.*, 2016).

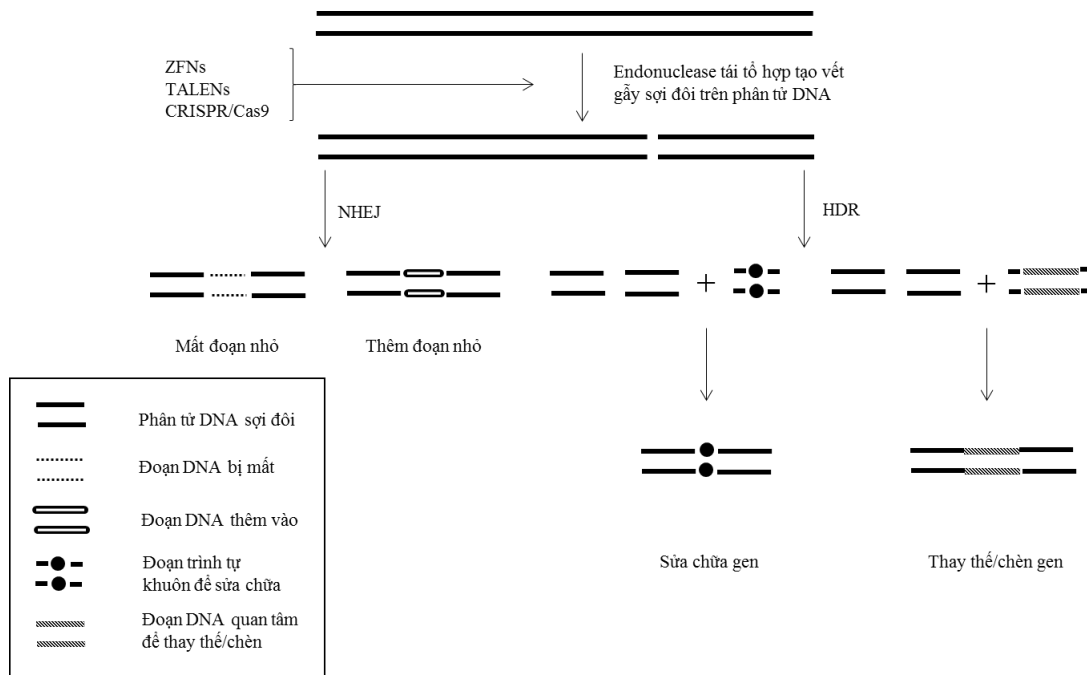
### XU HƯỚNG CHỈNH SỬA GEN VÀ TẠO CÂY NGÔ CHỊU HẠN

Trong vài năm trở lại đây, sự phát triển nhanh chóng của các công nghệ sửa chữa gen đã hỗ trợ cho việc chỉnh sửa gen đích hoặc gắn kết gen chuyển vào hệ gen thực vật có định hướng. Công nghệ này được kỳ vọng giúp cho sự chuyển gen vào cây được kiểm soát tốt, nhanh và chính xác hơn. Một trong các mặt hạn chế của các công nghệ chuyển gen thực vật hiện nay là quá trình chèn đoạn gen vào hệ gen của cây mang tính ngẫu nhiên. Nhất là khi các nhà khoa học đang cố gắng đưa nhiều gen mới vào cùng một giống cây biến đổi gen, thì sự sát nhập ngẫu nhiên của các đoạn gen sẽ gây khó khăn trong quá trình lai sau đó để tạo dòng thuần (Que *et al.*, 2010).

Hiện nay, 3 công cụ được sử dụng phổ biến để chỉnh sửa gen là zinc-finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) và hệ thống clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease protein (Cas) và đã đạt được nhiều kết quả khi thực hiện trên thực vật như khoai tây, ngô, lúa, (Gao *et al.*, 2010; Li

*et al.*, 2012; Cermak *et al.*, 2015). Cơ chế các công cụ này có thể hỗ trợ quá trình chuyển một gen tại vị trí xác định hoặc tạo đột biến định hướng dựa trên bộ máy sửa chữa đột biến tự nhiên trong tế bào. Thông thường, khi DNA xuất hiện một vết đứt sợi đôi (double-strand break), tế bào sẽ kích hoạt một trong hai bộ máy sửa chữa là HDR (homologous directed repair) và NHEJ (nonhomologous end-joining). Trong khi NHEJ có thể tạo ra các đoạn mất hoặc đoạn chèn nhỏ, HDR lại dựa vào vùng tương đồng trên NST chị em hoặc trong cặp nhiễm sắc thể tương đồng hoặc các vị trí tương đồng khác để sửa chữa

vùng đứt gãy. Các công cụ sửa chữa gen nêu trên có điểm chung là có khả năng nhận biết đặc hiệu một đoạn DNA sợi đôi và sẽ tạo ra vết đứt gãy sợi đôi trên phân tử DNA xác định. Nếu không có một sợi DNA khuôn với trình tự tương đồng với hai phía của vết gãy được bổ sung, cơ chế NHEJ được thực hiện và tạo ra các đột biến tại vị trí đó. Nếu sợi DNA khuôn được đưa vào đồng thời, tế bào sẽ dựa vào trình tự đó để tổng hợp vùng còn thiếu, từ đó một gen lỗi có thể được thay thế bằng một gen bình thường, hoặc một đoạn DNA mới hoàn toàn được chèn vào hệ gen tại vị trí xác định.



**Hình 3.** Sơ lược cơ chế hoạt động của ZNF-TALEN-CRISPR/Cas9.

ZFN là các protein được thiết kế để sửa chữa gen bằng cách tạo ra một đứt gãy sợi đôi ở vị trí đặc hiệu. ZFN bao gồm một domain bám DNA và một domain cắt DNA. Mỗi finger (ngón tay) nhận biết một trình tự gồm 3 - 4 nucleotide và các nhà khoa học có thể đích đến trình tự cần cắt bằng việc kết hợp các finger với nhau (tuy nhiên có một vài hạn chế). Domain bám DNA được tạo bởi từ 2 - 3 module finger và sẽ nhận biết một trình tự 6bp đặc trưng của DNA, trong khi domain cắt DNA được tạo thành từ domain endonuclease của FokI (một loại enzyme cắt DNA). Cả hai domain này tạo thành một chiếc kéo cắt vô cùng đặc hiệu. Một khi có đứt gãy sợi đôi, cơ chế NHEJ sẽ được áp dụng để sửa gen (Carroll, 2011).

TALEN được tạo thành bằng việc kết hợp các protein giống với nhân tố phiên mã được tiết bởi vi khuẩn *Xanthomonas* và FokI endonuclease. Giống như ZFN, bằng việc hợp nhất các TAL với nhau và với FokI, hệ gen có thể bị cắt ở vị trí nhất định. Khi TALEN tạo vết cắt sợi đôi, trình tự DNA sau đó được sửa lại để có thay đổi trong trình tự - như để knock out một vài gen hoặc chèn thêm một đoạn DNA mới. TALEN dễ dự đoán và thiết kế hơn so với ZFN và cung cấp một công cụ đơn giản hơn cho các nhà khoa học chỉnh sửa gen bất kì.

Công nghệ CRISPR dựa trên cơ chế miễn dịch của tế bào nhân sơ, lần đầu tiên được phát hiện ở vi khuẩn *E. coli*. Khi bị virus tấn công, tế bào vi khuẩn



sát nhập một đoạn DNA của virus vào giữa các trình tự của chúng để tạo nên một cơ sở dữ liệu bộ nhớ. Điều này cho phép vi khuẩn có thể nhận ra được loại virus tương tự nếu bị tấn công một lần nữa. Khi đó, vi khuẩn sẽ tổng hợp một loại enzyme cắt giới hạn là CRISPR-associated protein nuclease (Cas9) để phá hủy DNA của virus. CRISPR-Cas9 hiện nay là một công cụ đắc lực cho các nhà khoa học để sửa chữa hướng đích trình tự DNA trong hệ gen. Enzyme Cas9, là một endonuclease, được cải biến để phù hợp sử dụng trong công nghệ gen. Enzyme này được dẫn dắt bởi một phân tử RNA ngắn là gRNA (guide-RNA). Hệ thống CRISPR-Cas9 cho phép các nhà khoa học thiết kế các gRNA phù hợp với vị trí đích, từ đó định hướng enzyme Cas9 tạo điểm cắt trên vị trí đặc hiệu. Các công cụ chỉnh sửa như ZFN, TALEN, hay CRISPR và gRNA cũng cần được thiết kế trong hệ vector thích hợp và sau đó được chuyển vào cây thông qua phương pháp chuyển gen như súng bắn gen hoặc vi khuẩn *Agrobacterium*.

Trong ba công cụ trên, CRISPR/Cas9 hiện được coi là công cụ hiệu quả và có nhiều lợi thế so với các công cụ khác cũng như khả năng ứng dụng trong tạo cây biến đổi gen ở các khía cạnh chính xác, nhanh chóng, giá thành hợp lý và khả năng điều khiển cao. Khi kết hợp với các kỹ thuật tiên tiến khác trong công tác tạo giống, CRISPR được cho rằng có thể giúp cho việc gắn kết gen chuyển vào vị trí xác định trong hệ gen hoặc tạo đột biến có định hướng nhằm làm tăng năng suất cây trồng hoặc tăng cường/ giảm sự biểu hiện của gen quy định tính trạng nào đó. Về mặt công nghệ, CRISPR/Cas9 được coi là đơn giản hơn ZNF hoặc TALEN. Tuy nhiên khi chỉnh sửa gen từng loài, hệ thống này vẫn cần được tối ưu hóa các thành phần gồm enzyme Cas9, vector và gRNA đặc trưng cho mô và phương pháp chuyển gen. Việc chuyển hệ thống CRISPR/Cas9 này vào cây thường sử dụng phương pháp bắn gen hoặc thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*, nhưng hệ sử dụng vi khuẩn vẫn phổ biến hơn do ưu điểm đưa vào cây ít copy hơn (Char *et al.*, 2016).

Trong vài năm trở lại đây, sự phát triển trong công nghệ gen đã mang đến khả năng cải biến và chèn gen cần chuyển vào một vị trí nhất định trên NST của ngô (Shukla *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2014; Chilcoat *et al.*, 2017). Những nghiên cứu này sử dụng hoặc công nghệ ZFNs, TALEN hoặc CRISPR/Cas9. Svitashv và đồng tác giả (2016) công bố về việc sử dụng CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa genome ngô, phức hệ Cas9 và gRNA được đưa vào ngô thông qua bắn gen. Một nghiên

cứu khác đã thiết kế hệ vector cho CRISPR/Cas9 đặt tên là ISU Maize CRISPR để chỉnh sửa gen *Argonaute* và *dihydroflavonol 4 reductase* của ngô nhằm mục đích thiết lập nên một hệ chỉnh sửa hiệu quả cho ngô và đưa vào cây thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* (Char *et al.*, 2016). Trước đó, Liang và đồng tác giả (2014) đã sử dụng cả TALEN và CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen ngô, các phức hệ được đưa vào ngô thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Các nghiên cứu này đều cho thấy khả năng chỉnh sửa hoặc gây đột biến trên vùng gen đích của các phức hệ là khá chính xác. Tuy nhiên, theo thống kê của Ma và đồng tác giả (2016) thì hiệu quả gây đột biến đích khi sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* thường cao hơn khi dùng súng bắn gen. Gần đây, Shi và đồng tác giả đã sử dụng hệ thống chỉnh sửa CRISPR-Cas9 để thay thế promoter của gen *AGO8* của ngô bằng promoter của gen *GOS2* và làm tăng sự biểu hiện của *AGO8* dẫn đến tăng sức chống chịu hạn của cây ngô có chỉnh sửa gen (Shi *et al.*, 2017). Cây ngô có chỉnh sửa vùng promoter của gen *AGO8* này là một sản phẩm của công ty DuPont Pioneer và dự kiến sẽ được thương mại trong thời gian tới. Như vậy, các công cụ chỉnh sửa gen kể trên đang được áp dụng hiện nay thông qua việc chỉnh sửa gen, thay thế gen hoặc có thể chèn thêm gen vào một vị trí xác định đã góp phần làm tăng chất lượng các sự kiện chuyển gen cây trồng nói chung cũng như cây ngô chuyển gen có tính chịu hạn nói riêng.

## KẾT LUẬN

Như vậy, vấn đề nghiên cứu tạo cây ngô chịu hạn đã được nghiên cứu nhiều năm qua và vẫn đang được quan tâm hiện nay do sự nóng lên toàn cầu. Các nhà khoa học đã phân lập và xác định được nhiều gen, yếu tố có liên quan đến đáp ứng của thực vật với điều kiện hạn hán và sử dụng hiệu quả trong công nghệ gen. Các tiến bộ trong công nghệ gen được áp dụng trong các nghiên cứu cũng góp phần đẩy nhanh tiến trình tạo nên các giống ngô chịu hạn cũng như cây trồng khác. Các tiến bộ này nhằm phục vụ việc cải biến gen và lắp ghép các đoạn chức năng vào gen nhằm tăng cường sự biểu hiện của các gen trong cây ngô chuyển gen. Các thành phần quyết định đến sự biểu hiện của gen chuyển như promoter, các trình tự điều hòa hoặc trình tự tín hiệu cũng được làm rõ và cải biến để phù hợp với từng loại cây và từng tính trạng khác nhau. Hơn nữa, công cụ chỉnh sửa hệ gen như ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 cũng bước đầu được áp dụng để tạo cây ngô được chỉnh sửa hệ gen tuy chưa thật sự phổ biến. Đây là một

bước tiến mới trong công nghệ tạo cây trồng có đột biến hướng đích và mở ra những triển vọng mới trong tương lai đối với việc tạo cây ngô chịu hạn và những cây trồng khác được chỉnh sửa hệ gen.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “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 từ đề tài: “Đánh giá hiện trạng, năng lực và nhu cầu đổi mới công nghệ về nghiên cứu và ứng dụng công nghệ gen ở Việt Nam” mã số ĐM.11.DA/15 do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought - and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol* 131(4): 1748-1755.
- Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh AK, Singh VP, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi AK (2007) Genome-wide identification of *C2H2* zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol Biol* 65: 467-485.
- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix P J, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen T T, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers D A, Stoger E, Taylor N, Visser R. (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Breed* 15(3): 305-327.
- An G, Mitra A, Hong KC, Costa MA, An K, Thornburg RW, Ryan CA (1989) Functional analysis of the 3' control region of the potato *wound-inducible proteinase inhibitor II* gene. *Plant Cell* 1: 115-122.
- Babu, R. C., Zhang, J., Blum, A., Ho, T. H. D., Wu, R., & Nguyen, H. T. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci* 166(4): 855-862.
- Bae H, Kim SK, Cho SK, Kang BG, Kim WT (2011) Overexpression of OsRDCP1, a rice RING domain-containing E3 ubiquitin ligase, increased tolerance to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 180(6): 775-782.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2017) Báo cáo kết quả thực hiện kế hoạch tháng 12 năm 2017 ngành Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. <https://www.mard.gov.vn/Pages/thong-cao-bao-chi-thang-12.aspx>
- Boronat A, Martinez MC, Reina M, Puigdomenech P, Palau J (1986) Isolation and sequencing of a 28 kd glutenin-2 gene from maize: common elements in the 5' flanking regions among zein and glutenin genes. *Plant Sci* 47: 95-102.
- Cai G, Wang G, Wang L, Liu Y, Pan J, Li D (2014) A maize mitogen-activated protein kinase kinase, ZmMKK1, positively regulated the salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 171(12): 1003-1016.
- Cai R, Zhao Y, Wang Y, Lin Y, Peng X, Li Q, Chang Y, Jiang H, Xiang Y, Cheng B (2014) Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 119(3): 565-577.
- Carroll D (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188(4): 773-782.
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Ganesh K, Sara S, Robert D, Santiago N, Stephanie B, Mary F, Jayaprakash T, Santanu D, Christopher B, Michael HL, Jacqueline EH (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* 147: 446-455.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Mare C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res* 105: 1-14.
- Century K, Reuber TL, Ratcliffe OJ (2008) Regulating the regulators: The future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant Physiol* 147: 20-29.
- Cermak T, Baltus NJ, Cegan R, Zhang Y, Voytas DF (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16: 232.
- Chapman SC, Edmeades GO (1999) Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Sci* 39(5): 1315-1324.
- Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Yang B (2016) An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 15(2): 257-268.
- Chen LJ, Wuriyangan H, Zhang YQ, Duan KX, Chen HW, Li QT, Lin Q (2013) An S-domain receptor-like kinase, OsSIK2, confers abiotic stress tolerance and delays dark-induced leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 163(4): 1752-1765.

- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1833-1845.
- Chilcoat D, Liu ZB, Sander J (2017) *Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean*. In Donald PW, Yang B. *Progress in molecular biology and translational science*. Vol 149. Academic Press. Cambridge, MA: 27-46.
- CIMMYT (2013) The Drought Tolerant Maize for Africa project. DTMA Brief, September <http://dtma.cimmyt.org/index.php/about/background>.
- Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C (2008) Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J* 53: 53-64.
- Cui M, Zhang W, Zhang Q, Xu Z, Zhu Z, Duan F, Wu R (2011) Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. *Plant Physiol Bioch* 49: 1384-1391.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- De Buck S, De Paepe A, Depicker A (2013) Transgene expression in plants, Control of. *Sustainable Food Production*. Springer Science Business Media, New York, 1570-1593.
- Denecke J, Botterman J, Deblaere R (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 2: 531-550.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase, transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1: 561-573.
- Diehn SH, Chiu WL, De Rocher EJ, Green PJ (1998) Prematuration polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region. *Plant Physiol* 117: 1433-1443.
- Doebley J (2004) The genetics of maize evolution. *Annu Rev Genet* 38: 37-59.
- Du H, Wang N, Cui F, Li X, Xiao J, Xiong L (2010) Characterization of the  $\beta$ -carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant Physiol* 154(3): 1304-1318.
- Duan, J., & Cai, W. (2012). OsLEA3-2, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. *PLoS One* 7(9), e45117.
- Dutt M, Dhekney SA, Soriano L, Kandel R, Grosser JW (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* 1: 14047.
- Eby J, Held B, Hou L, Wilson H (2004) Methods and compositions for the introduction of molecules into cells. *United States Patent Application Publication*. US2004/0219676.
- Edmeades GO, J Bolaños, A Elings, JM Ribaut, M Bänziger, ME Westgate (2000) The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. *Physiology and modeling kernel set in maize* 43-73. CSSA Special Publication No. 29. CSSA, Madison, WI.
- FAOSTAT (2012) Food Supply. Cited October 10, 2013. <http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx>
- Frame BR, Drayton PR, Bagnall SV, Lewnau CJ, Bullock WP, Wilson HM, Dunwell JM, Thompson JA, Wang K (1994) Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J* 6: 941-948.
- Frame BR, McMurray JM, Fonger TM, Main ML, Taylor KW, Torney FJ, Paz MM, Wang K (2006) Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep* 25: 1024-1034.
- Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SE, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129(1): 13-22.
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY *et al.* (2009) *In vitro* reconstruction of an abscisic acid signaling pathway. *Nature* 462: 660-664.
- Gao H, Smith J, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson MG *et al.* (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J* 61: 176-187.
- Gao T, Wu Y, Zhang Y, Liu L, Ning Y (2011) *OsDIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 76: 145-156.
- Geiser M, Schweitzer S, Grimm C (1986) The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *Kurstaki* HD1. *Gene* 48: 109-118.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000) Overexpression of the arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124: 1854-1865.
- Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G & Smith RH (1991) Transformation of *Zea mays L.* using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol* 95(2): 426-434.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388(1): 151-157.

- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D (2005) Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* 137(1): 157-167.
- Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987) *Agrobacterium* mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 639-648.
- Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* 419: 247-259.
- Harper B, McClain S, Ganko EW (2012) Interpreting the biological relevance of bioinformatic analyses with T-DNA sequence for protein allergenicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 63: 426-432.
- Hiei Y, Ishida Y, Kasaoka K, Komari T (2006) Improved frequency of transformation in rice and maize by treatment of immature embryos with centrifugation and heat prior to infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 87: 233-243.
- Hood EE, Bailey MR, Beifuss K, Magallane-Lundback M, Callaway E (2003) Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol J* 1: 129-140.
- Hou X, Xie K, Yao J, Qi Z, Xiong L (2009) A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *PNAS* 106: 6410-6415.
- Hsieh TH, Lee JT, Chang YY, Chan MT (2002) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol* 130: 618-626.
- Hu YR, Dong QY, Yu DQ (2012) *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci* 185: 288-297.
- Huai J, Zheng J, Wang G (2009) Overexpression of a new Cys(2)/His(2) zinc finger protein ZmZFP1 from maize confers salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99: 117-124.
- Huang L, Liu Y, Lu C, Hsieh S, Yu S (2005) Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter in rice cell culture. *Transgenic Res* 14: 569-581.
- Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX (2009) A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes Dev* 23: 1805-1817.
- Hudspeth LW, Grula JW (1989) Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol Biol* 12: 579-589.
- Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Văn Trường, Bùi Mạnh Minh, Đoàn Thị Bích Thảo, Nguyễn Xuân Thắng, Nông Văn Hải, Bùi Mạnh Cường (2014) Thiết kế vector biểu hiện mang gen *modiCspB* và chuyển gen này vào cây Ngô. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 12(1): 125-132
- Ingelbrecht LW, Herman LMF, Dekeyser RA, Van Montagu MC, Depicker AG (1989) Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* 1: 671-680.
- IPCC (2014). *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Chapter 22, Africa.
- ISAAA (2016) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, New York.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14: 745-750.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* 47(1): 141-153.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Paneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol* 11: 100-105.
- James C (2015) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015*. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim JK (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol* 131(2): 516-524.
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do CY, Kim JK (2010) Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol* 153(1): 185-197.
- Jiang S, Zhang D, Wang L, Pan J, Liu Y, Kong X *et al.* (2013) A maize calcium-dependent protein kinase gene, *ZmCPK4*, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Bioch* 71: 112-120.

- Jiang SY, Bhalla R, Ramamoorthy R, Luan HF, Venkatesh PN, Cai M, Ramachandran S (2012) Over-expression of OSRIP18 increases drought and salt tolerance in transgenic rice plants. *Transgenic Res* 21(4): 785-795.
- Jiang W, Fu FL, Zhang SZ, Wu L, Li WC (2010) Cloning and characterization of functional trehalose-6-phosphate synthase gene in maize. *J Plant Biol* 53(2): 134-141.
- Joshi CP (1987) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res* 15: 9627-9640.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17(3): 287-291.
- Klümper W, Qaim M (2014) A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS One* 9(11): e111629.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci* 97: 2940-2945.
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- Kozziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R *et al.* (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat Biotechnol* 11: 194-200.
- Kuppu S, Mishra N, Hu R, Sun L, Zhu X, Shen G, Zhang H (2013) Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. *PLoS One* 8(5): e64190.
- Ladics GS, Bannon GA, Silvanovich A, Robert F, Cressman RF (2007) Comparison of conventional FASTA identity searches with the 80 amino acid sliding window FASTA search for the elucidation of potential identities to known allergens. *Mol Nutr Food Res* 51: 985-998.
- Lee JT, Prasad V, Yang PT, Wu JF, Ho THD *et al.* (2003) Expression of *Arabidopsis CBF1* regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without yield. *Plant Cell Environ* 26: 1181-1190.
- Lee LY, Gelvin SB (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol* 146(2): 325-332.
- Li H, Gao Y, Xu H, Dai Y, Deng DQ, Chen JM (2013) ZmWRKY33, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 70(3): 207-216.
- Li HS, Chang CS, Lu LS, Liu CA, Chan MT, Charng YY (2003) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (*AtHsf1b*) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. *Bot Bull Acad Sinica* 44: 129-140.
- Li HW, Zang BS, Deng XW, Wang XP (2011) Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234(5): 1007-1018.
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30: 390-392.
- Li X, Cao J (2016) Late embryogenesis abundant (*LEA*) gene family in maize: identification, evolution, and expression profiles. *Plant Mol Biol Rep* 34(1): 15-28.
- Li Y, Zhang J, Zhang J, Hao L, Hua J (2013) Expression of an *Arabidopsis* molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnol J* 11: 747-758.
- Li Y, Zhang J, Zhang J, Hao L, Hua J *et al.* (2013) Expression of an *Arabidopsis* molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnol J* 11: 747-758.
- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genom* 41: 63-68.
- Lightfoot DA, Mungur R, Ameziane R, Nolte S, Long L, Bernhard K, Young B *et al.* (2007). Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E. coli*. *Euphytica* 156(1-2): 103-116.
- Liu X, Zhai S, Zhao Y, Sun B, Liu C, Yang A, Zhang J (2013) Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene (*ZmPIS*) conferring drought stress tolerance by altering membrane lipid composition and increasing ABA synthesis in maize. *Plant Cell Environ* 36(5): 1037-1055.
- Lu G, Gao C, Zheng X, Han B (2009) Identification of OsZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice. *Planta* 229(3): 605-615.
- Lueharsen KR, Walbot V (1994) The impact of AUG start codon context on maize gene expression in vivo. *Plant Cell Rep* 13: 454-458.
- Luo X, Bai X, Sun XL, Zhu D, Liu BH, Ji W, Cai H, Cao L, Wu J, Hu MR, Liu X, Tang LL, Zhu YM (2013) Expression of wild soybean *WRKY20* in *Arabidopsis* enhances drought tolerance and regulates ABA signalling. *J Exp Bot* 64(8): 2155-2169.
- Lutcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA (1987) Selection of AUG initiation codon differs in plants and animals. *EMBO J* 6: 43-48.
- Ma X, Zhu Q, Chen Y, Liu YG (2016) CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol plant* 9(7): 961-974.

- MARS (2012) *Crop monitoring in Europe*. MARS Bulletin Vol. 20 No. 1:1 26 November, 2012 (<http://www.mars.jrc.ec.europa.eu/mars/bulletins-publications>).
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant J* 38(6): 982-993.
- Mason HS, DeWald D, Mullet JE (1993) Identification of a methyl jasmonateresponsive domain in the soybean vspB promoter. *Plant Cell* 15: 241-251.
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Lopato S (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnol J* 9(2): 230-249.
- Msanne J, Lin J, Stone JM, Awada T (2011) Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta* 234(1): 97-107.
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 406-410.
- Murai N (2013) Review: Plant Binary Vectors of Ti Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a Broad Host-Range Replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1. *Am J Plant Sci* 4(4): 932-939.
- Murray EE, Lotzer J, Eberle M (1989) Codon usage in plants. *Nucleic Acids Res* 17: 477-498.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* 50: 1345-1363.
- Nakashima K, Tran LS, Nguyen VD, Fujita M, Maruyama K (2007) Functional analysis of aNAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* 51: 617-630.
- Nguyen TX, Nguyen T, Alameldin H, Goheen B, Loescher W, Sticklen M (2013) Transgene pyramiding of the *HVA1* and *mtlD* in T3 maize (*Zea mays* L.) plants confers drought and salt tolerance, along with an increase in crop biomass. *Int J Agro* 598163.
- Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu, Lê Thị Mai Hương, Lê Thị Lan, Nguyễn Chiến Hữu, Lê Huy Hàm, (2013) Nghiên cứu tạo giống ngô chịu hạn bằng công nghệ gen, *Hội thảo quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ nhất* 405-411.
- Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L (2010) A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 152(2): 876-890.
- Nuccio ML, Wu J, Mowers R, Zhou HP, Meghji M, Primavesi LF, Basu SS, Paul MJ, Chen X, Gao Y, Haque E, Lagrimini LM (2015) Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nat biotechnol* 33(8): 862-869.
- Nunn N, Qian N (2010) The Columbian exchange: A history of disease, food, and ideas. *J Econ Perspect* 24(2): 163-88.
- Nuss ET, Tanumihardjo SA (2010) Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 9: 417-436.
- Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK (2007) Expression of barley *HvCBF4* enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 5(5): 646-656.
- Ohme-Takagi M, Taylor CB, Newman TC, Green P (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11811-11815.
- Omirulleh S, Abraham M, Golovkin M, Stefanov I, Karabaev MK, Mustardy L, Moroc S, Dudits D (1993) Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol Biol* 21: 415-428.
- Orellana S, Yanez M, Espinoza A, Verdugo I, Gonzalez E, Ruiz-Lara S, Casaretto JA (2010) The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell Environ* 33(12): 2191-2208.
- Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E (2011) Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol J* 9(7): 747-758.
- Peng X, Zhao Y, Cao J, Zhang W, Jiang H, Li X, Ma Q, Zhu S, Cheng B (2012) CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments. *PLoS One* 7: e40120.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant J* 50(1): 54-69.
- Quan R, Shang M, Zhang H, Zhao Y, Zhang J (2004) Engineering of enhanced glycine betaine synthesis

- improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnol J* 2(6): 477-486.
- Que Q, Chilton MDM, deFontes CM, He C, Nuccio M, Zhu T, Wu Y, Chen JS, Shi L (2010) Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. *GM Crops* 1: 220-229.
- Redillas MC, Jeong JS, Kim YS, Jung H, Bang SW, Choi YD, Kim JK (2012) The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol J* 10(7): 792-805.
- Reeves WR, Peter TA (2010) *Petition for the determination of non-regulated status for MON 87460*. St. Louis, MO: Monsanto.
- Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KL (1988) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 6: 56-60.
- Rothstein SJ, Lahners KN, Lostein RJ, Carozzi NB, Jayne SM (1987) Rice DA: promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation. *Gene* 53: 153-161.
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedling during stress. *Nat Biotechnol* 15: 988-991.
- Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, Chen X, Finer JJ, Shen QJ, Rushton PJ (2012) WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnol J* 10: 2-11.
- Saad ASI, Li X, Li HP, Huang T, Gao CS, Guo MW, Liao YC (2013) A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. *Plant Sci* 203: 33-40.
- Saibo NJM, Lourenco T, Oliveira MM (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annual Botany* 103: 609-623.
- Sakuma Y, Q Liu, JG Dubouzet, H Abe, K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression *Biochem Biophys Res Commun* 290: 998-1009.
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GI, Borst-Vrens AT, Zilverentant JF, Bakker J (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 30(4): 781-793.
- Shen H, Liu C, Zhang Y, Meng X, Zhou X, Chu C, Wang X (2012) OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 80(3): 241-253.
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Habben JE (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* 15(2): 207-216.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response *Plant Physiol* 115(2): 327.
- Shiriga K, Sharma R, Kumar K, Yadav SK, Hossain F, Thirunavukkarasu N (2014) Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta gene* 2: 407-417.
- Shou H, Bordallo P, Wang K (2004) Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J Exp Bot* 55: 1013-1019.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC., Moehle EA., Worden SE *et al.* (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437-441.
- Singer SD, Cox KD, Liu Z (2011) Enhancer-promoter interference and its prevention in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 30: 723-731.
- Sticklen M, Nguyen T, Alameldin H, Goheen B (2013) Bacterial Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase (*mtlD*) Transgene, Confers Salt Tolerance in the Fourth Generation Transgenic Maize (*Zea mays*. L) Plants. *Adv Crop Sci Tech* 1:112. doi:10.4172/2329-8863.1000112
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Cigan AM (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 7: 13274.
- Tang N, Zhang H, Li X, Xiao J, Xiong L (2012) Constitutive activation of transcription factor OsbZIP46 improves drought tolerance in rice. *Plant Physiol* 158(4): 1755-1768.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16(9): 2481-2498.
- Ülker B, Somssich IE (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7(5): 491-498.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol* 17(2): 113-122.

- Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17306-17311.
- USDA (2018) Animal and Plant Health Inspection Service. Petitions for Determination of Nonregulated Status. <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/permits-notifications-petitions/petitions/petition-status>
- USDA (2018) FAS Grain: World Markets and Trade. Cited March 8, 2018.
- Vain P, Finer KR, Engler DE, Pratt R, Finer J (1996) Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays L.*) and bluegrass (*Poa pratensis L.*). *Plant Cell Rep* 15: 489-494.
- Wallington TJ, Anderson JE, Mueller SA, Kolinski ME, Winkler SL, Glinder JM, Nielsen OJ (2012) Corn ethanol production, food exports, and indirect land use change. *Environ Sci Technol* 46: 6379-6384.
- Wang AS, Evans RA, Altendorf PR, Hanten JA, Doyle MC, Rosichan JL (2000) A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Rep* 19: 654-660.
- Wang CT, Song W (2013) Calcium-dependent protein kinase gene *ZmCPK12* from maize confers tolerance to drought and salt stresses in transgenic plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(5): 1659-1666.
- Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C (2008) Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol* 67(6): 589-602.
- Wei A, He C, Li B, Li N, Zhang J (2011) The pyramid of transgenes *TsVP* and *BetA* effectively enhances the drought tolerance of maize plants. *Plant Biotechnol J* 9(2):216-229.
- Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L (2008) Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* 148(4): 1938-1952.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2000) Overexpression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 115: 35-46.
- Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF, Xiong LZ (2009) Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol Plant* 2(1): 73-83.
- Xiong X, James VA, Zhang HN, Altpeter F (2010) Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass. *Mol Breed* 25(3): 419-432.
- Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS (2008) Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa L.*). *FEBS letters* 582(7): 1037-1043.
- Xue GP, Way HM, Richardson T, Drenth J, Joyce PA, McIntyre CL (2011) Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Mol Plant* 4(4): 697-712.
- Yadav NS, Shukla PS, Jha A, Agarwal PK, Jha B (2012) The *SbSOS1* gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na<sup>+</sup> loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco. *BMC Plant Biol* 12(1): 188.
- Yadav NS, Singh VK, Singh D, Jha B (2014) A novel gene *SbSI-2* encoding nuclear protein from a halophyte confers abiotic stress tolerance in *E. coli* and tobacco. *PLoS One* 9(7): e101926.
- Yang A, Dai X, Zhang WH (2012) A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 63(7): 2541-2556.
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y (2010) Narrowing down the targets: Towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol Plant* 3(3): 469-490.
- Ying S, Zhang DF, Fu J, Shi YS, Song YC, Wang TY, Li Y (2012) Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, *ZmbZIP72*, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 235(2): 253-266.
- You J, Hu H, Xiong L (2012) An ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene *OsOAT* confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci* 197:59-69.
- You J, Zong W, Li X, Ning J, Hu H, Li X, Xiong L *et al.* (2012) The SNAC1-targeted gene *OsSRO1c* modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. *J Exp Bot* 64(2): 569-583.
- Yu J, Peng P, Zhang X, Zhao Q, Zhu D, Sun X, Liu J, Ao G (2005) Seed-specific expression of the lysine-rich protein gene *sb401* significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. *Food Nutr Bull* 26: 312-316.
- Yu LX, Shen X, Setter TL (2015) Molecular and functional characterization of two drought-induced zinc finger proteins, *ZmZnF1* and *ZmZnF2* from maize kernels. *Environ Exp Bot* 111: 13-20.
- Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK (2004) From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer



salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol* 135: 615-621.

Zhang Z, Liu X, Wang X, Zhou M, Zhou X, Ye X, Wei X (2012) An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of

defense-and stress-related genes. *New Phytol* 196(4): 1155-1170.

Zhang Q, Li J, Zhang W, Yan S, Wang R, Zhao J, Zhu Z *et al.* (2012) The putative auxin efflux carrier OsPIN3t is involved in the drought stress response and drought tolerance. *Plant J* 72(5): 805-816.

## GENETIC ENGINEERING IN DEVELOPING DROUGHT TOLERANCE MAIZE AND ITS NEW PROSPECTS

Huynh Thi Thu Hue<sup>1,2</sup>, Nguyen Thuy Linh<sup>1</sup>, Nguyen Hai Ha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Maize is one of the most important cereals in human civilization. However, the productivity of crops has been being adversely affected by increasing droughts as a consequence of the global climate change. Recently, the yield and production of a number of maize growing regions witnessed a significant decrease due to continuously droughts. To minimize the impacts of the water-shortage condition, many measures have been taken. Among them, genetic engineering helps enhance plant survival by transferring drought-tolerance related genes into maize. Hundreds of drought-responsive genes from maize or other species have been isolated and characterized. Those genes encode transcription factors and proteins involving in signal transduction pathways as well as cell protection mechanisms. However, in order to highly and precisely express interested genes in transgenic maize, it is necessary to modify genes by using proper codon usage frequency, adding signals of post-transcriptional, translational and post-translational regulations. Additionally, other components of transformation process such as vector systems, promoters, gene delivery procedures, etc. are required to be optimized. Results from drought-tolerant trait related studies which has been being heavily invested in are worth the effort. Recently, new genetic engineering approaches known as genome editing are being accomplished and applied to a wide range of species. The advanced techniques including ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9 hold enormous potential for drought-tolerant crop development. It is believed that in the near future, genome-edited based cultivars are more elite than traditional ones.

**Keywords:** *CRISPR/Cas9, gene editing, genetic engineering, gene transformation, maize*