

TẠO CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN GS1 TĂNG CƯỜNG HIỆU QUẢ SỬ DỤNG NITROGEN

Nguyễn Thị Hồng Gấm^{1,2}, Trần Thị Hương Giang¹, Bùi Phương Thảo¹, Nguyễn Văn Đoàn¹, Nguyễn Thị Thơm¹, Bùi Văn Thắng², Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài: 06.01.2016

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) là enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển hóa glutamic acid thành glutamine phụ thuộc vào ATP, dùng ammoniac như một cơ chất. GS có tác dụng làm biến đổi tất cả nitrogen ở dạng vô cơ tích hợp vào các hợp chất hữu cơ. Trong tế bào, GS hiện diện ở cả lục lạp (GS2) và tế bào chất (GS1). Trong đó, dạng glutamine synthetase ở tế bào chất của thực vật có khả năng đồng hóa nguồn nitrogen trong tế bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế thành công một vector chuyển gen pBI121::GS1 dưới sự điều khiển bởi promoter 35S. Vector này được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và chuyển gen GS1 vào mảnh lá thuốc lá. Sau năm tuần nuôi cấy, có 28 dòng thuốc lá ra rễ trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc Kanamycin 50mg/l. Sau đó, các mảnh lá bánh tẻ từ các cây thuốc lá có khả năng ra rễ được lựa chọn để đánh giá ở các thí nghiệm tiếp theo. Có 5 dòng cây thuốc lá mang gen chuyển GS1 đã được chứng minh bằng phương pháp PCR và lai Southern. Đánh giá hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen GS1 trong điều kiện *in vitro* cho thấy: khối lượng tươi của mô, số chồi tạo thành, chiều cao chồi và khả năng ra rễ của cây thuốc lá chuyển gen GS1 vượt trội so với cây không chuyển gen ở cả môi trường có nồng độ nitrogen thấp (0,1X - 0,2X). Đánh giá sinh trưởng của cây trồng ở nhà lưới cho thấy, cây thuốc lá chuyển gen GS1 sinh trưởng nhanh hơn so với cây không chuyển gen (chiều cao cây tăng thêm sau 03 tháng trồng 43,55% và 33,29% sau 05 tháng trồng ở nhà lưới). Kết quả chuyển gen vào thuốc lá cung cấp cơ sở khoa học để phát triển các cây trồng biến đổi gen có khả năng tăng cường hiệu quả sử dụng nitrogen.

Từ khóa: Gen GS1, cây thuốc lá chuyển gen, tăng cường hiệu quả sử dụng nitrogen

MỞ ĐẦU

Nitrogen một trong những nguyên tố cần thiết và đóng vai trò quan trọng nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, là nhân tố cấu trúc cơ bản nên các phân tử nucleic acid và protein trong tế bào. Trong cây, nitrogen có thể được đồng hóa hoặc tái sử dụng thông qua các cơ chế đồng hóa nitrogen từ môi trường và nitrogen giải phóng từ các quá trình quang hô hấp và các quá trình trao đổi chất khác như quá trình sinh tổng hợp phenyl propanoid và sự huy động nitrogen trong một vài protein.

GS1 là một octamer enzyme bao gồm các tiểu đơn vị nhỏ, có khối lượng phân tử từ 38 - 41kDa, phụ thuộc vào các loài khác nhau. Trong một số loài như thuốc lá, cà chua, thông... GS1 của lá được cấu tạo từ các dạng tiểu đơn vị có kích thước giống nhau, nhưng ở các đối tượng khác, ví dụ cây đậu nành, phân tử GS1 được cấu tạo bởi hai tiểu đơn vị có kích thước khác nhau (Becker

et al., 1992; Canton *et al.*, 1999; Dubois *et al.*, 1996). Thêm vào đó, các thí nghiệm phân tích bằng điện di hai chiều xác định ở cây đậu Pháp, phân tử GS1 được tạo thành từ hai chuỗi polypeptid khác nhau. Sự khác nhau này sẽ liên quan đến sự hoạt động của enzyme và chức năng sinh lý của chúng. Những khảo sát xa hơn về mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của các polypeptid của GS1, những nghiên cứu sử dụng đột biến gen trong ống nghiệm đã tiến hành và xác nhận được vai trò quan trọng của các acid amin chìa khóa trong tính chất xúc tác của enzyme (Clemente và Marquez, 1999).

Gallardo *et al.*, (1999) đã nghiên cứu chuyển gen GS1 dưới sự điều khiển của promoter 35S vào cây Dương lai (*Populus tremula x P.alba 7171*), kết quả cho thấy cây chuyển gen GS1 sinh trưởng nhanh hơn so với cây đối chứng tới 76% đối với cây 2 tháng tuổi và 21,3% đối với cây 6 tháng tuổi. Bên cạnh đó, dòng Dương lai chuyển gen GS1 đã được trồng khảo nghiệm từ năm 2000 tại tỉnh Granada của Tây Ban

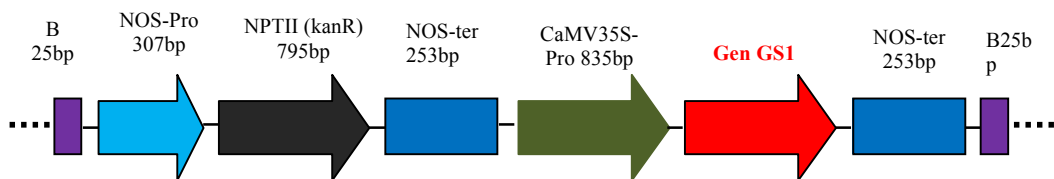
Nha và cho thấy các dòng cây chuyển gen GS1 đều có mức độ biểu hiện enzyme GS cao và có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn so với giống gốc không chuyển gen, ví dụ chiều cao của cây chuyển gen tăng 21% đối với cây trồng 1 năm tuổi, 36% đối với cây trồng 2 năm tuổi và 41% đối với cây trồng 3 năm tuổi (Jing *et al.*, 2004).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, vector chuyển gen pBI121 mang gen *GS1* được thiết kế và thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, vector pBI121:GS1 được chuyển vào thuốc lá để tạo cây thuốc lá chuyển gen nhằm tăng cường hiệu quả sử dụng nitrogen phục vụ cho công tác cải thiện giống cây trồng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 và vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen pBI121:GS1 (Hình 1) do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.



Hình 1. Sơ đồ vector chuyển gen pBI121:GS1. (*GS1*: gen mã hóa cho glutamine synthetase; *CaMV35S*: promoter 35S của virus khảm súp lơ; *nptII*: gen chọn lọc kháng kháng sinh kanamycine; *Nos*: trình tự kết thúc của gen nopaline synthase).

Kiểm tra các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp PCR

Sau 3-4 tuần phát triển ngoài nhà lưới, các cây thuốc lá chuyển gen được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu GS1F (3'-TCTAGAGAGAGATCCTTTTCTGCTCTTTGAA-5') và GS1R (3'-GAGCTCAATCGGAAAACGAGGGAAAG-5') theo chu kỳ nhiệt 94°C/4 phút; 30 chu kỳ [94°C/40 giây; 56°C/40 giây; 72°C/1 phút] 72°C/7 phút; bảo quản sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm trong dung dịch ethium bromine và quan sát dưới đèn UV.

Phân tích các dòng cây chuyển gen bằng phương pháp lai Southern

DNA tổng số (40-50 µg) của mỗi dòng được cắt

Phương pháp

Quy trình chuyển gen

Quy trình chuyển gen vào giống thuốc lá K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo Topping (1998). Các mảnh lá có diện tích khoảng 1cm² được làm tổn thương bằng lưỡi dao cắt bốn cạnh xung quanh và được ngâm trong dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang vector pBI121:GS1, ở nồng độ OD₆₀₀ = 0,7 trong 10 phút. Các mảnh lá được loại bỏ dịch khuẩn thừa bằng giấy thấm đã khử trùng và được đặt lên môi trường đồng nuôi cây trong 2 ngày và nuôi trong tối. Tiếp theo, các mảnh lá được chuyển sang môi trường tái sinh cây GM có bổ sung kháng sinh chọn lọc bao gồm 1mg/l BAP, 500mg/l cefotaxime và 50mg/l kanamycine. Sau 2-3 tuần, các cụm chồi hình thành được cắt và chuyển sang môi trường GM. Khi chồi đạt chiều cao 2-3 cm sẽ được cắt và cấy chuyển sang môi trường ra rễ RM (MS có bổ sung 500mg/l cefotaxime và 50mg/l kanamycine). Cây con có khoảng 4 rễ dài 1 cm trở lên, chiều cao từ 3 đến 5 cm được chuyển ra trồng ở nhà lưới, trên giá thể trấu: cát (tỷ lệ 1:1).

bằng enzyme hạn chế *Hind*III trong 16-18 giờ và phân tách trên gel agarose 0,8% ở điện thế 40-50V, 12-14 giờ. Gel được nhuộm biến tính trong dung dịch 0,4 N NaOH và 0,2 M NaCl, trung hòa trong 0,5 M Tris-HCl và 0,2 M NaCl, pH 7. Sau đó, DNA được chuyển lên màng nylon theo phương pháp thấm ngược qua đêm trong dung dịch kiềm (0,4M NaOH). Màng nylon được rửa trong dung dịch 2X SSC và để khô trong nhiệt độ phòng, sau đó cố định mẫu trên màng ở nhiệt độ 65°C, trong 2 giờ.

Màng lai được xử lý với dung dịch tiền lai (6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0,5% SDS, 50% (v/v) deionized formamide) ở 44°C trong 4h. Sau đó, màng lai được lai với dung dịch lai chứa mẫu dò GS1 gắn Biotin (100 ng/ml) ở 44°C qua đêm. Mẫu dò GS1 gắn biotin được tổng hợp dựa vào sản phẩm PCR của gen GS1 được nhân từ vector tách dòng

theo hướng dẫn của bộ kit Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific). Cuối cùng màng lai được rửa ở 66°C (dung dịch rửa 0,1 SSC và 0,1% SDS) và hiện bằng trên màng lai theo hướng dẫn của bộ kit theo Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Scientific).

Đánh giá in vitro hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen

Chúng tôi tiến hành cắt lá của cây thuốc lá không chuyển gen (WT) và cây chuyển gen GS1 thành các mảnh nhỏ có diện tích khoảng 1cm² và chuyển lên môi trường MS và môi trường GM có hàm lượng nitrogen giảm dần từ 3550 mg NO₃/l (được coi là 1X) (bao gồm hỗn hợp NH₄NO₃ và KNO₃), xuống 0,5X, 0,2X và 0,1X. Sau 2-3 tuần, tiến hành đánh giá khả năng tạo đa chồi từ các mảnh lá dựa vào số lượng các cụm chồi hình thành/mảnh lá.

Chồi cây WT và cây chuyển gen GS1 đạt chiều cao 2-3 cm được chuyển sang môi trường ra rễ tương ứng là MS và RM có hàm lượng nitrogen giảm dần. Đánh giá khả năng tạo rễ của cây vào giai đoạn cây 2 tuần tuổi và 3 tuần tuổi.

Đánh giá in vivo hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen

Các cây thuốc lá sau khi trồng ở nhà lưới 2-4 tuần, có kích thước tương đối đồng đều được chọn để tiến

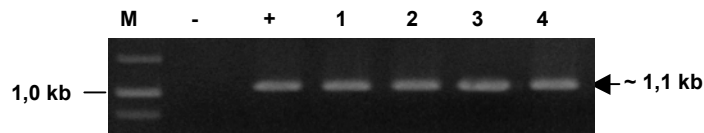
hành thí nghiệm đánh giá hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen qua chiều cao cây đạt được ở giai đoạn 3 và 5 tháng tuổi trong điều kiện môi trường khô hạn, thiếu ánh sáng, không được cung cấp chất dinh dưỡng trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển của cây.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

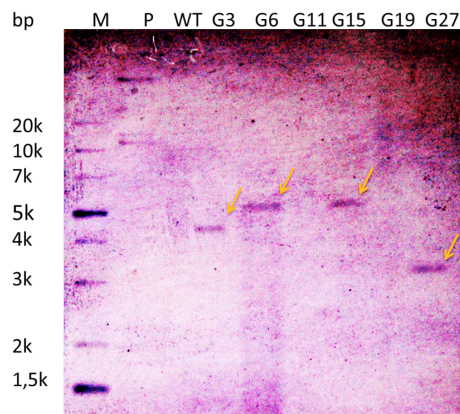
Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc pBI121:GS1

Vector chuyển gen pBI121 mang gen GS1 dưới sự điều khiển của promoter 35S được chuyển vào mảnh lá cây thuốc lá giống K326. Kết quả đã thu được 32 dòng sống sót và sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc, có chứa kháng sinh chọn lọc kanamycine (50mg/l). Tất cả 32 dòng này đều có khả năng sinh trưởng bình thường sau khi chuyển ra trồng ngoài nhà lưới. Việc đánh giá sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá được tiến hành trên các cây 1 tháng tuổi được trồng trong nhà lưới bằng phương pháp PCR.

Kết quả cho thấy 25/32 dòng cho kết quả dương tính với gen chuyển khi đều xuất hiện 01 băng vạch có kích thước khoảng 1050bp, tương đương với kích thước của gen GS1 (Hình 2). Điều này bước đầu chứng tỏ các dòng cây này có thể mang gen chuyển GS1 như mong muốn.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR. (M: Marker 10 kb; (-): đối chứng âm, cây thuốc lá không chuyển gen; (+): đối chứng dương, plasmid mang gen GS1; 1-4: các dòng thuốc lá chuyển gen GS1).



Hình 3. Kết quả phân tích lai Southern. (M: Marker 1Kb; P: đối chứng dương, plasmid pBI121:GS1; WT: Cây không chuyển gen; G3-G27: các dòng thuốc lá chuyển gen GS1).

Kết quả phân tích lai Southern

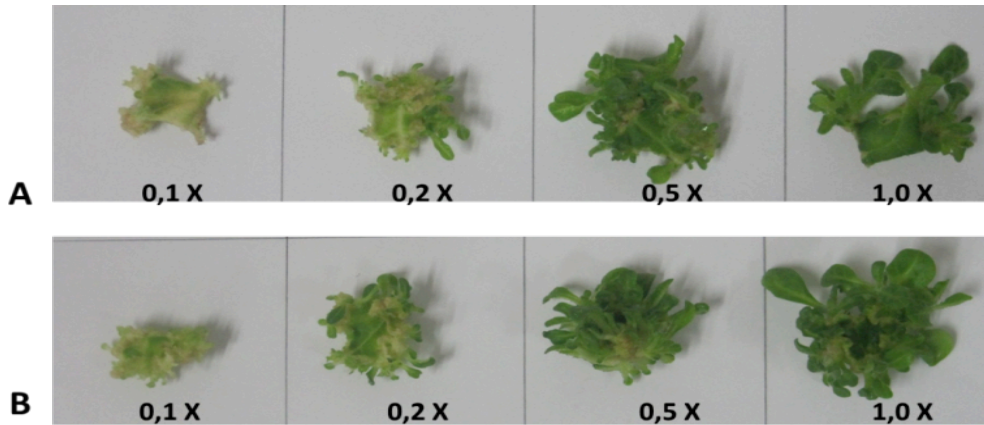
Để khẳng định việc gắn kết ổn định của gen chuyển trong genome của các cây thuốc lá chuyển gen, phương pháp lai Southern đã được ứng dụng. Kết quả phân tích lai Southern của 06 dòng trên hình 3 cho thấy, ngoại trừ dòng số 11 và 19 bốn dòng thuốc lá còn lại đều xuất hiện 01 băng (dòng số 3, 6, 15, 27) tương đương với 01 bản sao của gen chuyển trong genome của cây thuốc lá chuyển gen. Thêm vào đó, kích thước của các băng xuất hiện ở các dòng không giống nhau, cho thấy các dòng chuyển gen được phân tích là các sự kiện chuyển gen độc lập, không trùng lặp. Trong khi đó, dòng đối chứng không chuyển gen cho kết quả âm tính, điều đó chứng tỏ kết quả lai là đặc hiệu. Như vậy, có thể khẳng định rằng chúng tôi đã chuyển thành công gen GS1 vào các dòng thuốc lá.

Đánh giá *in vitro* hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen

Sự tương tác giữa biểu hiện của gen GS1 đến việc sử dụng hiệu quả nguồn nitrogen từ môi trường nuôi cấy đã được đánh giá ở 25 dòng chuyển thông qua, khả năng hình thành đa chồi, chồi từ mảnh lá của cây chuyển gen và khả năng ra rễ của các chồi đã được đánh giá trên môi trường có nồng độ nitrogen khác nhau: 1X; 0,5X; 0,2X, 0,1X.

Mặc dù khả năng tạo đa chồi tăng khi nồng độ nitrogen tăng, nhưng trên môi trường có cùng nồng độ nitrogen, không quan sát được sự khác biệt về phản ứng tạo đa chồi giữa mảnh lá không chuyển gen và mảnh lá chuyển gen GS1 (Hình 4).

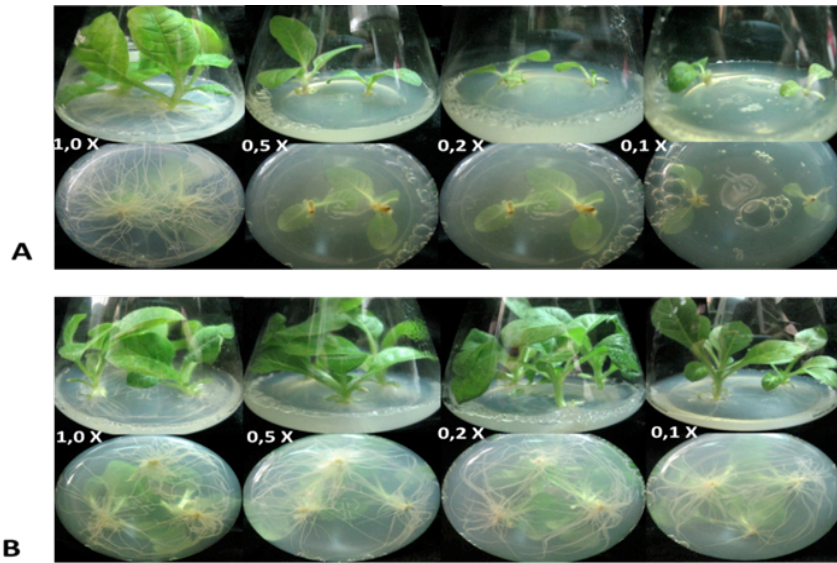
Tương tự, khối lượng mô, tổng số chồi trên một mảnh lá và chiều cao trung bình của chồi sau 1 tháng cũng không khác biệt đáng kể giữa các mảnh lá từ hai nguồn gốc cây ban đầu (Bảng 1).



Hình 4. Kết quả đánh giá khả năng tạo đa chồi trên môi trường có nồng độ nitrogen thay đổi. (A: cây thuốc lá WT; B: Cây thuốc lá chuyển gen GS1; X: Nồng độ nitrogen của môi trường MS).

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng tạo đa chồi trên môi trường có nồng độ nitrogen thay đổi.

Thuốc lá	Khối lượng mô sau 1 tháng				Tổng số chồi trên 1 mảnh lá sau 1 tháng				Chiều cao trung bình của chồi sau 1 tháng			
	0,1 X	0,2X	0,5X	1X	0,1 X	0,2X	0,5X	1X	0,1 X	0,2X	0,5X	1X
GS1	0,58	1,12	1,98	1,84	1,13	5,13	9,13	9,13	0,39	0,71	0,88	0,84
WT	0,33	0,60	1,06	0,76	1,0	2,0	10,0	7,0	0,5	0,55	0,75	1,1



Hình 5. Kết quả đánh giá khả năng tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường ra rễ có nồng độ nitrogen thay đổi. (A: cây thuốc lá WT; B: cây thuốc lá chuyển gen GS1; X: Nồng độ nitrogen của môi trường MS).

Tuy nhiên, phản ứng của chồi chuyển gen trên môi trường ra rễ thể hiện sự ưu việt so với cây không chuyển gen. Khi nồng độ nitrogen giảm dần, cây chuyển gen GS1 vẫn có khả năng phát triển bộ rễ hoàn chỉnh, có chiều dài như ở nồng độ nitrogen bình thường, cây phát triển tốt, lá xanh đậm, chồi mập (Hình 5B). Trong khi đó, cây đối chứng không chuyển gen, không có khả năng ra rễ khi nồng độ nitrogen bắt đầu giảm xuống một nửa (0,5X) (Hình 5A). Kèm theo đó, cây còi cọc không có khả năng phát triển thành hoàn chỉnh.

Như vậy, việc biểu hiện của GS1 trong cây chuyển gen có tác động tích cực trong việc sử dụng nitrogen hiệu quả trong giai đoạn ra rễ. Cây chuyển gen có thể ra rễ và phát triển tốt kể cả trong điều kiện môi trường bị thiếu hụt nguồn nitrogen. Kết quả này tương tự với nhiều nghiên cứu đã cho thấy hoạt động của gen GS1 phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển khác nhau của cây (Finnenmann *et al.*, 2000; Habash *et al.*, 2001).

Đánh giá *in vivo* hiệu quả sử dụng nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen

Nitrogen có vai trò đặc biệt quan trọng đối với quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật. Các dòng thuốc lá chuyển gen và không chuyển gen sau khi ra cây trên giá thể được 2-4 tuần, có độ đồng đều về kích thước được chuyển ra ngoài môi trường với điều kiện thiếu chất dinh dưỡng, đất khô cằn, trong điều kiện ánh sáng không thuận lợi cho quá trình

quang hợp. Kết quả trong hình 6 cho thấy, khả năng phát triển của cây chuyển gen nhanh hơn so với cây đối chứng sau 5 tháng trong nhà lưới.



Hình 6. Đánh giá khả năng sử dụng hiệu quả nitrogen của cây thuốc lá chuyển gen. (WT: Cây đối chứng không chuyển gen; D-1: dòng thuốc lá chuyển gen GS1).

Ta thấy tốc độ phát triển chiều cao của cây chuyển gen nhanh hơn 31% so với cây đối chứng ở giai đoạn 3 tháng tuổi và 25% ở giai đoạn 5 tháng tuổi (Bảng 2).

Bảng 2. Bảng so sánh chiều cao cây đối chứng và cây chuyển gen GS1.

Công thức	Chiều cao cây 3 tháng tuổi (cm)	Chiều cao cây 5 tháng tuổi (cm)
WT	90,67 ± 2,08 ^a	119,66 ± 1,52 ^a
GS1	130,16 ± 2,31 ^b	159,5 ± 3,78 ^b

Ghi chú: (Trong cùng một cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$).

Nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy khi mức độ biểu hiện của GS1 tăng lên kéo theo việc tăng hoạt tính của GS và tăng tốc độ phát triển của cây. Ví dụ, Fuentes và cộng sự đã chỉ ra rằng: biểu hiện cao của GS1 dưới sự điều khiển của promoter CaMVS35 trong cây thuốc lá đã làm tăng hoạt tính của GS trong các mô lá, tăng cường quá trình phát triển trong điều kiện thiếu nitrogen nhưng không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng trong điều kiện phân bón đầy đủ (Fuentes *et al.*, 2001). Cây thuốc lá biểu hiện GS1, phân lập từ cây lê, dưới sự điều khiển của promoter CaMVS35 lại đồng thời làm tăng hoạt tính GS, hàm lượng protein GS và khả năng sinh trưởng (Corruzi *et al.*, 2006). Gần đây, Unkefer và cs đã thu được cây thuốc lá chuyển gen mang gen GS1 của cỏ ba lá, có hàm lượng 2-hydroxy-5-oxoproline trong lá được tăng lên đáng kể, dẫn tới tăng tốc độ sinh trưởng của cây chuyển gen tăng gấp nhiều lần so với cây không chuyển gen (Unkefer *et al.*, 2013).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, biểu hiện cao của GS1 đã thúc đẩy việc sử dụng hiệu quả nitrogen, có tác dụng đặc biệt trong thời gian đầu của quá trình sinh trưởng, thúc đẩy sự phát triển của thân lá và quá trình quang hợp tích lũy chất hữu cơ. Ở cây đối chứng không chuyển gen (WT) có biểu hiện hoàn toàn ngược lại. Cây không có khả năng phát triển trong các điều kiện bất thuận, thiếu nguồn nitrogen. Kết quả này có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc sử dụng cấu trúc pBI21:GS1 để biến nạp vào các loài cây trồng khác, nâng cao khả năng hấp thụ và sử dụng nguồn nitrogen nhất là trong điều kiện cây trồng bị thiếu hụt nguồn nitrogen cần thiết cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu chuyển gen GS1 vào cây thuốc lá đã cho thấy các dòng cây thuốc lá chuyển gen mang genGS1đều sinh trưởng bình thường trên môi trường có nồng độ nitrogen thấp nhất là 0,1X ở điều kiện *in vitro* và sinh trưởng nhanh hơn về chiều cao so với dòng đối chứng không chuyển gen với tốc

độ là 31% đối với cây 3 tháng tuổi và 25% đối với cây 5 tháng tuổi trong điều kiện bất thuận về dinh dưỡng và quang hợp ở điều kiện nhà lưới. Điều đó chứng tỏ rằng cấu trúc pBI21:GS1 có thể sử dụng để biến nạp vào các cây trồng khác nhằm nâng cao năng suất và sức chống chịu của cây trong điều kiện thiếu hụt nitrogen.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn u rô (*Eucalyptus urophylla*) sinh trưởng nhanh bằng công nghệ chuyển gen” thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker TW, Caboche M, Carrayol E, Hirel B (1992) Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light-inducibility, organ specificity and diurnalrhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol Biol* 19: 367-379.
- Bernard SM, Habash DZ (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol* 182: 608-620.
- Cantón FR, Suarez MF, Jose-Estanyol M, Cánovas F (1999) Expression analysis of a cytosolic glutamine synthetase gene in cotyledons of scots pine seedlings: Developmental regulation and spatial distribution of specific transcripts. *Plant Mol Biol* 40: 623-634.
- Clemente MT, Marquez AJ (1999) Site-directed mutagenesis of Glu-297 from the [alpha] – polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase alters kinetic and structural properties and confers resistance to L-methionine sulfoximine. *Plant Mol Biol* 40: 835-845.
- Cren M, Hirel B (1999) Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol* 40: 1187-1193.
- Cruz C, Bio AFM, Dominguez-Valdivia MD, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C, Martins-Loucao MA (2006) How

- does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* 223: 1068-1080.
- Dubois F, Brugière N, Sangwan RS, Hirel B (1996) Localisation of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts show organ-and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol* 31: 803-817.
- Fuentes SI, Allen DJ, Ortiz-Lopez A, Herná'ndez G (2001) Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J Exp Bot* 52: 1071-1081.
- Gallardo F, Fu J, Cantón FR, García-Gutiérrez A, Cánovas FM, Kirby EG (1999) Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* 210: 19-26.
- Jing ZP, Gallardo F, Pascual MB, Sampalo R, Romero J, Torres de Navarra A, Ca novas DM (2004) Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytol* 164: 137-145.
- Sampalo R, Romero J, de Navarra AT, Cánovas FM (2004) Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytol* 164: 37-145.
- Temple SJ, Knight TJ, Unkefer PJ, Sengupta-Gopalan C (1993) Modulation of glutamine synthetase gene expression in tobacco by the introduction of an alfalfa glutamine synthetase gene in sense and antisense orientation: molecular and biochemical analysis. *Mol Gen Genet* 236: 315-325.
- Topping JF (1998) Tobacco transformation. In *Foster GD, Taylor SC, Plant virology protocol*, vol 81: 365-485.
- Unkefer PJ, Anderson PS, Knight TJ (2013) Plant glutamine phenylpyruvate transaminase gene and transgenic plants carrying same. *U.S. Patent* Nos. US 20130232641 A1.

PRODUCTION OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS EXPRESSING *GS1* GENE FOR THE INCREASE OF NITROGEN USE EFFICIENCY

Nguyen Thi Hong Gam^{1,2}, Tran Thi Huong Giang¹, Bui Phuong Thao¹, Nguyen Van Doai¹, Nguyen Thi Thom¹, Bui Van Thang², Pham Bich Ngoc¹, Chu Hoang Ha¹✉

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Glutamine synthetase (GS, CE 6.3.1.2) is an enzyme that catalyzes the ATP-dependent condensation of glutamic acid with ammonia to yield glutamine. Glutamine synthetase is a key enzyme involved in the assimilation of inorganic nitrogen into organic forms. In plant cells, GS is present in both chloroplasts (GS2) and cytoplasm (GS1), in which GS1 can assimilate nitrogen source. In this study, one transgenic vector pBI121 carrying GS1 gene under the control of promoter 35S (pBI121::GS1) were successfully constructed. This vector containing GS1 gene was transformed into tobacco leaves pieces via *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. Five weeks after cultivation, there were 28 tobacco lines which had roots on the medium added kanamycin 50 mg/l. Then, the presence of GS1 gene in these tobacco lines was tested from leaves in the next experiments. PCR and Southern blot confirmed that there are five tobacco lines carrying transferred GS1 gene. The effectiveness of nitrogen using in GS1 transgenic tobacco plants *in vitro* was evaluated. The tissue fresh weight, number and height of shoots forming buds and rooting ability of GS1 transgenic tobacco plants were greater than those of non-GM plants in the medium of low nitrogen concentration (0.1X - 0.2X). Assessment of crop growing in a greenhouse demonstrated that GS1 transgenic tobacco plants grow faster than non-transgenic ones. In detail, the increment of plant height after planting 03 months and 05 months in greenhouse is 43.55% and 33.29%, respectively. These results provide a scientific basis for the development of other genetically modified plants which enhanced nitrogen-use efficiency.

Keywords: Gen *GS1*, transgenic tobacco plant, enhanced nitrogen-use efficiency

✉ Author for correspondence: E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn