Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Tập 33, Số 2S (2017) 77-83

Nghiên cứu chuyển gen mã hóa cho GA20-oxidase dưới sự điều khiển của promoter CAD4 biểu hiện đặc hiệu ở xylem vào cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum)*

Nguyễn Hồng Nhung[1], Bùi Phương Thảo[1], Nguyễn Văn Đoài[1], Nguyễn Văn Phong[2], Lê Thị Vân Anh[3], Phạm Bích Ngọc[1,*]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

[2]*Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp, Hà Nội*

[3]*Tạp chí Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017
Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về chuyển gen mã hóa cho GA20-oxidase vào thực vật đã tạo được các dòng chuyển gen*GA20ox* có tác dụng khả năng kéo dài thân và gia tăng sinh khối. Tuy nhiên, một số tác giả nhận thấy sự biểu hiện quá mức của *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter cơ định mang lại những tính trạng bất lợi cho cây như giảm kích thước lá và sự phát triển của rễ. Trong nghiên cứu này, vector chuyển gen nhị thể pBI121 chứa gen *GA20ox* mã hóa cho GA20-oxidase dưới sự điều khiển của promoter CAD4 đặc hiệu ở xylem (phân lập từ cây Dương lai (*Populus trichocarpa*) đã được thiết kế. Vector thiết kế này được chuyển gen vào giống Thuốc lá (*Nicotiana tabacum)* K326 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và thu được kết quả gen chuyển được biểu hiện đặc hiệu ở vùng xylem qua phản ứng RT-PCR. Các dòng thuốc lá chuyển gen đều có khả năng sinh trưởng tốt hơn so với mẫu đối chứng, chiều cao cây tăng từ 20-60%, tốc độ sinh trưởng trung bình gấp đến 1,66 lần. Gen chuyển *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 tăng khả năng biệt hóa xylem, độ rộng vùng xylem của các dòng chuyển gen tăng lên từ 17-59% so với cây đối chứng. Vector chuyển gen mã hóa cho GA20-oxidase dưới sự điều khiển của promoter CAD4 được thiết kế và chuyển gen vào cây mô hình có thể được sử dụng trong tạo giống cây trồng lâm nghiệp có khả năng sinh trưởng nhanh và cho sinh khối gỗ lớn.

Từ khóa: Nicotiana tabacum, GA20-oxidase, CAD4.

1. Mở đầu

Gibberellin (GA) là các hợp chất sinh trưởng thuộc dạng diterpenes có vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình sinh trưởng và có ảnh hưởng đến các quá trình phát triển khác nhau ở thực vật bao gồm sự nảy mầm của hạt, sinh trưởng của thân, ra hoa và tạo quả. GA cũng được biết đến với vai trò kích thích phân chia tế bào ở tầng phát hiện và tăng trưởng nhanh chóng của các sợi xylem kéo dài. Cho đến nay đã xác định được hơn 136 chất thuộc nhóm này, tuy nhiên chỉ một vài chất là có hoạt tính sinh học, ví dụ như GA1 và GA4 [1].

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-912247887.
Email: pbngoc@ibt.ac.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4586

Trong số các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp GA dạng hoạt động, gen mã hoá cho GA20-oxidase *(GA20ox*) nắm giữ vai trò chính trong việc điều khiển quá trình này [2]. Các nghiên cứu gần đây về tách dòng gen mã hóa cho enzyme sinh tổng hợp GA mở ra triển vọng cải biến sự biểu hiện của chúng trong cây chuyển gen để nghiên cứu về chức năng và cơ chế điều hòa. Tăng cường sự tổng hợp *GA20ox* mã hóa cho GA20-oxidase dẫn đến mức độ tổng hợp GA dạng hoạt động tăng lên [3-5]. Khi tăng cường biểu hiện gen mã hóa cho GA20-oxidase ở cây dương chuyển gen, sự sinh trưởng kéo dài của lóng thân và tăng sinh khối gỗ đã được ghi nhận. Tuy nhiên, biểu hiện quá mức *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter cơ định có thể gây nên các tính trạng bất lợi cho cây như giảm kích thước thân, lá và ra rễ kém [6]. Do đó, việc sử dụng promoter đặc hiệu nhằm mục đích kiểm soát mức độ biểu hiện của *GA20ox*ở một số mô, cơ quan nhất định là rất cần thiết. Chuyển gen vào thực vật sử dụng promoter đặc hiệu mạch dẫn (phloem/xylem) cho phép gen đích biểu hiện đặc hiệu ở mạch dẫn và là một biện pháp đầy hứa hẹn trong việc kiểm soát các bệnh ở hệ mạch [7-8]

Promoter của gen *CAD4* sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ cây Dương lai (*Populus trichocarpa)*. Gen *CAD4* mã hóa cho Cinamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD) – enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp lignin.Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh promoter của *CAD4* có tính đặc hiệu mạch dẫn (xylem) [9].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Cây Thuốc lá (*Nicotiana tabacum)* K326 nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

2.1.2. Chủng vi khuẩn và vector

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α và *A. tumefaciens* C58 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Vector tách dòng pBT chứa gen *GA20ox* phân lập từ cây *Arabidopsis thaliana* và vector chuyển gen pBI 101 chứa promoter CAD4 điều khiển biểu hiện gen *GUS* do phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

2.1.3. Hóa chất thí nghiệm

- Kit tinh sạch DNA (AccuPrep Gel Purification Kit)

- Kit tách chiết và tinh sạch plasmid (Plasmid Extraction Kit)

- Cặp mồi nhân gen của hãng Bioneer (Hàn Quốc)

Trình tự cặp mồi đặc hiệu sử dụng để nhân đoạn gen *GA20ox*

F/GA20-SmaI	CCCGGGATGGCCGT AAGTTTCGTAACAA
R/GA20	GAGATGAGTTTCTGTT CGATGGGTTTGGTG

- Các loại enzyme cắt giới hạn (*Sma*I, *Sac*I), *Taq polymerase*, dNTPs, thang DNA 1 kb của hãng Fermentas (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen mang gen GA20ox dưới sự điều khiển của promoter CAD4

Vector chuyển gen pBI101/CAD4::*GUS* và vector pBT/*GA20ox* được cắt bằng cặp enzyme giới hạn *SmaI* và *SacI* sau đó ghép nối với nhau để tạo plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp này được biến nạp vào E. coli DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt và kiểm tra bằng phản ứng colony – PCR với cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *GA20ox*. Chu kỳ nhiệt độ phản ứng PCR như sau: 94^{o}C: 5 phút, 35 chu kỳ [94^{o}C: 40 giây,58^{o}C:40 giây, 72^{o}C: 1 phút], 72^{o}C: 7 phút, 4^{o}C: ∞.

Plasmid Extraction Kit (Bioneer) được sử dụng để tách chiết plasmid đối với các khuẩn

lạc mang gen chuyển sau khi kiểm tra bằng phản ứng PCR. Các mẫu plasmid tái tổ hợp được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Sac*I và *Hind*III.

2.2.2. Phương pháp tạo dòng vi khuẩn A. tumefaciens mang vector chuyển gen CAD4::GA20ox

Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *A. Tumefaciens* khả biến bằng phương pháp xung điện và được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu khuếch đại đoạn gen *GA20ox* để chọn lọc các dòng tế bào mang vector biến nạp.

2.2.3. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn A. tumefaciens

Phương pháp chuyển gen vào thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo phương pháp của Topping và cộng sự (1998) có cải tiến [10].

2.2.4. Phương pháp đánh giá biểu hiện của gen chuyển trong cây chuyển gen

Các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng được thu để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB của Collins và Symons (1992), sau đó được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu gen chuyển *GA20ox*. RNA tổng số tách chiết từ các bộ phận khác nhau (thân và lá) được dùng để tổng hợp cDNA và kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu nhân đoạn gen *GA20ox* (RT-PCR).

2.2.5. Phương pháp đánh giá các chỉ tiêu sinh lý của cây chuyển gen

Đánh giá tốc độ sinh trưởng: Đo chiều cao thân cây các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng tính từ gốc cho đến đỉnh sinh trưởng sau mỗi tháng.

Phương pháp giải phẫu: Lát cắt ngang thân ở lóng thứ 4 của các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng được nhuộm xylem bằng Đỏ Carmine và Xanh methylene. Tiêu bản được soi dưới kính hiển vi ở vật kính 4X, 10X và chụp ảnh. Độ rộng vùng xylem được đo bằng phần mềm xử lý hình ảnh ImageJ.

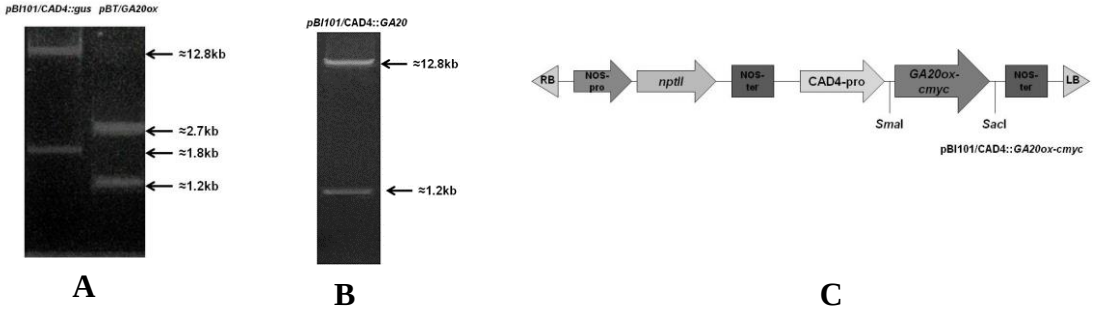
Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thiết kế vector chuyển gen mang gen GA20ox dưới sự điều khiển của promoter CAD4

Vector tách dòng pBT/*GA20ox* chứa 2 điểm cắt của enzyme giới hạn *Sma*I và *Sac*I tại 2 đầu 5' và 3' của gen *GA20ox* (gắn đuôi *cmyc*). Đồng thời, vector pBI101/*CAD4::gus* cũng chứa điểm cắt của enzyme giới hạn *Sma*I và *Sac*I tại 2 đầu của gen *gus*. Kết quả phản ứng cắt thể hiện ở hình 1A cho thấy sản phẩm cắt plasmid pBT/*GA20ox* gồm có 2 băng DNA rõ ràng: 1 băng DNA có kích thước khoảng 2,7 kb đúng với kích thước của vector pBT; 1 băng DNA có kích thước khoảng 1,2 kb (chính xác là 1176 bp) tương ứng với gen *GA20ox*. Sản phẩm cắt plasmid pBI101/*CAD4::gus* gồm có 2 băng: 1 băng DNA có kích thước khoảng 12,8 kb tương ứng với vector pBI101/*CAD4* và 1 băng DNA có kích thước khoảng 1,8 kb tương ứng với gen *gus*, điều này chứng tỏ phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn đã xảy ra hoàn toàn và đúng vị trí.

Kết quả sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp pBI101/*CAD4::GA20* bằng enzyme *Sma*I và *Sac*I ở hình 1C cho 2 băng kích thước khoảng 12,9 kb và 1,2 kb đúng với kích thước tính toán của vector pBI101 mang promoter CAD4 và gen *GA20ox*. Vector này được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumerfaciens* chủng C58 và chọn lọc trên môi trường bổ sung 50mg/l Kanamycin và 50mg/l Rifamycin, phản ứng PCR khuẩn lạc cũng đã được thực hiệnvới cặp mồi đặc hiệu khuếch đại đoạn gen *GA20ox* cho kết quả dương tính (kết quả không chỉ ra ở đây). Các kết quả trên chứng tỏ đã tạo được thành công chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* mang vector chuyển gen *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 (sơ đồ vector chuyển gen thể hiện ở hình 1C).



Hình 1. Kết quả thiết kế vector chuyển gen mang gen *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4.
A: Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pBI101/*CAD4::gus* và pBT/*GA20* bằng enzyme *Sma*I và *Sac*I
B: Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pBI101/*CAD4::GA20* bằng enzyme *Sma*I và *Sac*I
C: Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen nhị thể pBI101/*CAD4::GA20ox*

3.2. Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc CAD4::GA20ox

3.2.1. Kết quả chuyển cấu trúc CAD4::GA20ox vào thuốc lá

Trong nghiên cứu này, giống thuốc lá K326 (*N. tabacum*) làm đối tượng để chuyển cấu trúc CAD4::*GA20ox* đã thiết kế nhằm đánh giá nhanh ảnh hưởng của cấu trúc này đến khả năng tái sinh và tỷ lệ chuyển gen của mẫu nuôi cấy cũng như mức độ biểu hiện của gen chuyển. Ba lô thí nghiệm đã được thực hiện và thu được kết quả tỷ lệ tái sinh chồi chuyển gen là 76,67%, tỷ lệ ra rễ là 91,11%.

3.2.2. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển cấu trúc CAD4::GA20ox

Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong 15 dòng thuốc lá ra rễ trên môi trường chọn lọc và 1 dòng đối chứng không chuyển gen (WT) thu được ở hình 2A cho thấy tất cả các dòng chuyển gen đều xuất hiện băng DNA kích thước khoảng 1,2 kb đúng với kích thước lý thuyết của đoạn gen *GA20* (1176bp).

Kết quả thực hiện RT-PCR ở hình 2B cho thấy gen chuyển được biểu hiện nhiều nhất ở mẫu thân trong khi mẫu lá không biểu hiện, khẳng định sự điều khiển biểu hiện gen của promoter CAD4 có tính đặc hiệu ở xylem. Lê Thị Vân Anh và cộng sự khi chuyển gen *gus* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 vào cây Dương cũng nhận thấy biểu hiện của GUS mạnh nhất ở các bộ phận có chứa xylem [11].

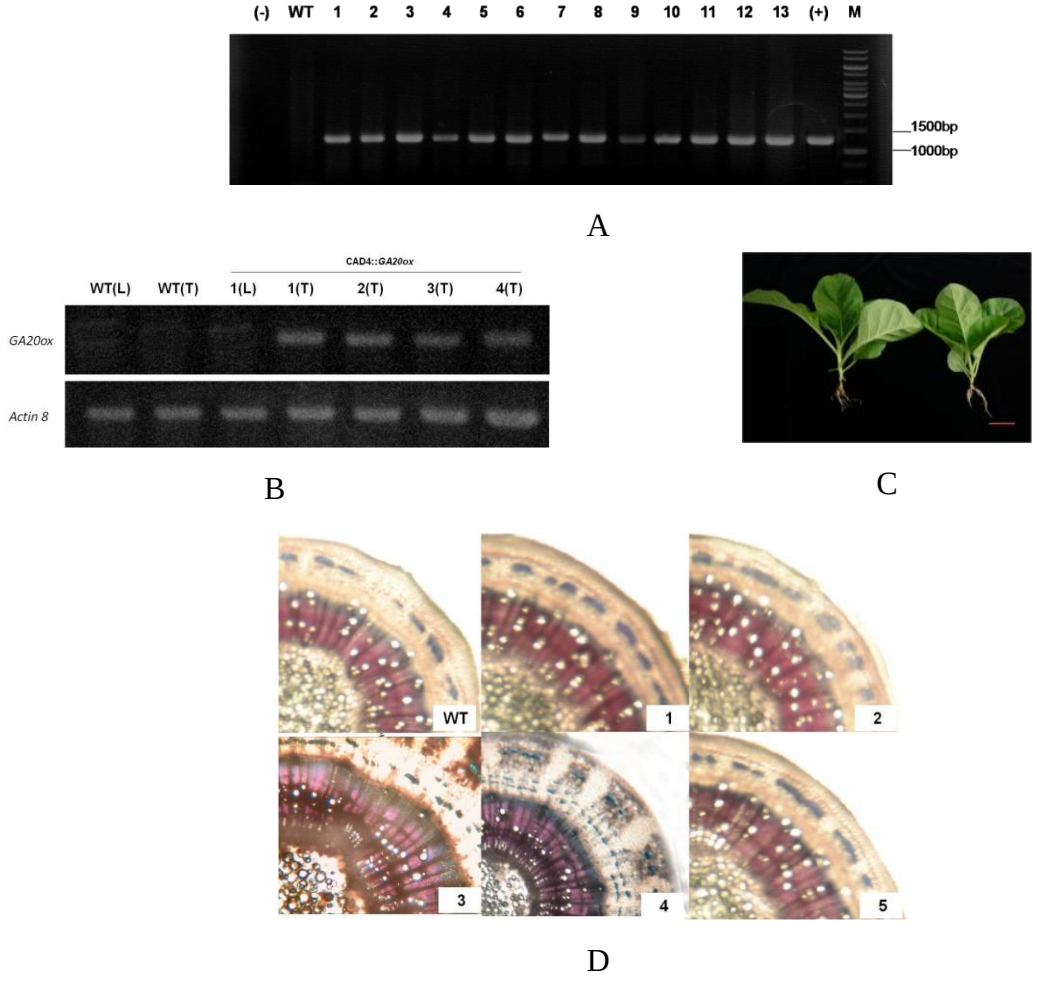
Sự tăng cường biểu hiện của gen *GA20ox* ở vùng xylem đã dẫn đến sự mở rộng vùng xylem của các dòng chuyển gen so với dòng đối chứng. Điều này được thể hiện ở kết quả giải phẫu lát cắt ngang thân các dòng chuyển gen (hình 2D) và đo độ rộng vùng xylem (3C).

3.2.3. Kết quả đánh giá sơ bộ các chỉ tiêu sinh lý của các dòng thuốc lá chuyển cấu trúc CAD4::GA20ox

Sau 2 tháng trồng trong nhà lưới, cả 5 dòng thuốc lá chuyển gen pCAD4::*GA20ox* được lựa chọn ngẫu nhiên đều cao hơn so với cây đối chứng không chuyển gen, kết quả được thể hiện trong hình 3A. Đáng chú ý, hai dòng số1 và 2 cho kết quả chiều dài thân lớn nhất, tương ứng gấp 1,61 và 1,39 lần so với cây WT. Tốc độ tăng trưởng trung bình của 2 dòng chuyển gen 4 và 11 lần lượt là 0,59 cm/ngày và 0,51 cm/ngày so với cây đối chứng là 0,36 cm/ngày. Kết quả này giống với các nghiên cứu đã công bố trước đây về chuyển gen *GA20ox* vào các đối tượng thực vật khác nhau như khoai tây [12]; thuốc lá [9]; dương; cải dầu [13]. Kết quả đo đường kính thân ở hình 3B cho thấy biểu hiện của *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 đã hạn chế được những tính trạng bất lợi.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của *GA20ox* đến sự hình thành xylem thể hiện trong hình 3C cho thấy độ rộng vùng xylem của các mẫu

thuốc lá chuyển gen đều lớn hơn so với mẫu đối chứng, cụ thể là tăng từ 17-59% (dòng 1-4) so với mẫu đối chứng. Do đó, GA20-oxidase có vai trò quan trọng đối với quá trình biệt hóa xylem và ảnh hưởng đến sự phát triển của xylem thứ cấp do đó việc tăng cường biểu hiện GA dẫn đến độ rộng vùng xylem tăng lên. Kết quả này tương đồng với những kết quả nghiên cứu trước đó của Jeon và cộng sự (2015) trên đối tượng cây *Arabidopsis thaliana* và cây dương [13].



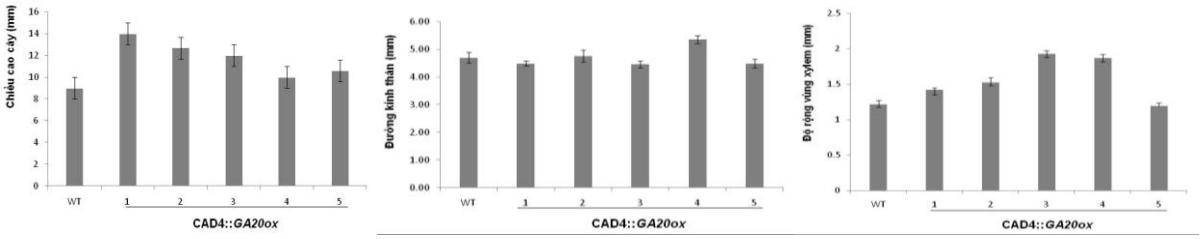
Hình 2. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen CAD4::*GA20ox*

A: Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *GA20ox* trong các dòng thuốc lá chuyển gen (- *: Đối chứng âm - sản phẩm PCR với thành phần phản ứng không chứa DNA; WT: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA tổng số tách chiết từ cây WT; 1-13: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA tổng số tách chiết từ cây chuyển gen CAD4::GA20ox dòng 1-13 tương ứng; (+): Đối chứng dương - sản phẩm colony- PCR vi khuẩn A.tumefaciens C58 mang vector chuyển gen CAD4::GA20ox; M: Thang chuẩn DNA 1kb*)

B: Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gen *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 trong các dòng thuốc lá chuyển gen *(WT(T), (L): Kết quả RT-PCR mẫu thân, lá của dòng đối chứng;1(L): Kết quả RT-PCR mẫu lá của dòng chuyển gen 1; 1(T), 2(T), 3(T), 4(T): Kết quả RT-PCR mẫu thân của các dòng chuyển gen 1, 2, 3, 4)*

C: Hình ảnh cây thuốc lá chuyển gen dòng 1 (trái) và dòng đối chứng (phải) sau 1 tháng trồng trong điều kiện nhà lưới

D: Kết quả giải phẫu lát cắt ngang thân của các dòng thuốc lá chuyển gen CAD4::GA20ox 1-5 và đối chứng (WT)



A B C

Hình 3. Kết quả đánh giá sơ bộ các chỉ tiêu sinh lý của các dòng thuốc lá chuyển cấu trúc CAD4::*GA20ox*.
A: Kết quả đo chiều cao thân các dòng thuốc lá chuyển gen CAD4::*GA20ox* 1-5 và dòng đối chứng (WT) sau 2 tháng trồng trong điều kiện nhà lưới
B: Kết quả đo đường kính thân (phần cách mặt đất 5cm) các dòng thuốc lá chuyển gen CAD4::*GA20ox* 1-5 và dòng đối chứng (WT) sau 2 tháng trồng trong điều kiện nhà lưới
C: Kết quả giải phẫu lát cắt ngang thân và đo độ rộng vùng xylem của các dòng thuốc lá chuyển gen CAD4::*GA20ox* 1-5 và đối chứng (WT)

3. Kết luận

Vector chuyển gen nhị thể pBI121 chứa gen *GA20ox* mã hóa cho GA20-oxidase dưới sự điều khiển của promoter CAD4 đặc hiệu ở xylem (phân lập từ cây Dương lai *Populus trichocarpa*) đã được thiết kế và chuyển gen vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens.*Thông qua phản ứng RT-PCR, gen chuyển được biểu hiện đặc hiệu ở vùng xylem. Các dòng thuốc lá chuyển gen đều có khả năng sinh trưởng tốt hơn so với mẫu đối chứng, chiều cao cây tăng từ 20-60%, tốc độ sinh trưởng trung bình gấp đến 1,66 lần. Gen chuyển *GA20ox* dưới sự điều khiển của promoter CAD4 làm tăng khả năng biệt hóa xylem, độ rộng vùng xylem của các dòng chuyển gen tăng lên từ 17-59% so với cây đối chứng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí Đề tài "Nghiên cứu chọn tạo và đánh giá các dòng xoan ta biến đổi gen sinh trưởng nhanh có triển vọng", Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp – Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

Tài liệu tham khảo

[1] Dayan J., Gibberellin transport. Annual Plant Reviews 49 (2016) 95.

[2] Hedden P., Thomas S. G., Gibberellin biosynthesis and its regulation, Biochemical Journal 444 (2012) 11.

[3] Eriksson, M. E., Israelsson, M. Olsson, Moritz T., Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length, Nature Biotechnology 18 (2000) 784.

[4] Yaxley J. R., Gibberellin Biosynthesis Mutations and Root Development in Pea, Plant Physiology 125 (2011) 627.

[5] Yamaguchi S., Gibberellin Metabolism and its Regulation, Annual Review of Plant Biology 59 (2008) 225.

[6] Yamaguchi S., Kamiya Y., Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals, Plant Cell Physiol 41 (2000) 251.

[7] Hedden P., Kamiya Y., Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48 (1997) 31.

[8] Feuillet C., Lauvergeat V., Deswarte C., Pilate G., Boudet A., Grima-Pettenati J., Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants, Plant Molecular Biology 27 (1995) 651.

[9] Niu S., Li Z., Yuan H., Fang P., Chen X., Li W., Proper gibberellin localization in vascular tissue

is required to regulate adventitious root development in tobacco, Journal of Experimental Botany 64 (2013) 3411.

[10] Topping J., Tobacco Transformation, Plant Virology Protocols 4 (1998) 365.

[11] Le Thi Van Anh, T. D. E., Characterization of poplar metal transporters to improve rehabilitation of metal polluted soils, Institut des Sciences du Végétal, 2012.

[12] Carrera E., Bou J., Garcia-Martínez, J. L., Prat S., Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants, Plant Journal 22 (2012) 247.

[13] Jeon H. W., Cho J. S., Park E. J., Han K. H., Choi Y. I., Ko J. H., Developing xylem-preferential expression of PdGA201, a gibberellin 20-oxidase 1 from Pinus densiflora, improves woody biomass production in a hybrid poplar, Plant Biotechnology Journal 14 (2015) 1161.

Transformation of GA20-oxidase Gene under Regulation of Xylem-specific Promoter CAD4 in Tobacco (*Nicotiana tabacum)*

Nguyen Hong Nhung[1], Bui Phuong Thao[1], Nguyen Van Doai[1], Nguyen Van Phong[2], Le Thi Van Anh[3], Pham Bich Ngoc[1]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

[2]*Institute of Forestry Biotechnology, Forestry University, Hanoi, Vietnam*

[3]*Journal of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Overexpression of *GA20ox* gene encoding GA20-oxidase in plants have resulted in increasing stem elongation and improving growth rate. However, constitutive overexpression of *GA20ox* driven by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter is frequently accompanied by undesirable phenotypes such as poor rooting and small leaves. In this study, transgenic binary vector pBI101 carrying *GA20ox* gene encoding GA20-oxidase (binding *c-myc* tail) under the control of xylem-specific promoter CAD4 was successfully constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. All the transgenic lines showed the xylem-specific expression of GA20-oxidase when using RT-PCR reaction. All 5 selected transgenic tobacco lines exhibited enhanced stem elongation compared to wild type (WT) control lines, the stem heights of transgenic lines increased from 20 to 60%, compared to that of WT lines. The stem elongation of transgenic lines had rates of up to 1,66 folds higher than that of WT. The histological staining of stem cross section showed that all the selected transgenic lines exhibit an substantial increase in xylem differentiation compared to WT, xylem widths of transgenic lines increase from 17-59% than WT. The constructed vector can be used to transform in other woody plants to produce transgenic lines which grow rapidly and enhance wood formation.

Keywords: Nicotiana tabacum, GA20-oxidase, CAD4.