

# THIẾT KẾ CẤU TRÚC VECTOR CRISPR/Cas9 CHỈNH SỬA GEN TÍN HIỆU CỦA HOOC MÔN BRASSINOSTEROID Ở CÂY CÀ CHUA

Lã Văn Hiền<sup>1,2\*</sup>, Trương Thanh Tùng<sup>3</sup>, Lã Thị Thảo<sup>4</sup>, Nguyễn Văn Tịnh<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học Sự sống, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu cây trồng thích ứng với biến đổi khí hậu, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

<sup>4</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông Nghiệp Việt Nam

<sup>5</sup>Khoa Khoa học cơ bản, Trường Đại học Y-Dược Buôn Ma Thuột

## TÓM TẮT

Yếu tố tín hiệu của hoóc môn brassinosteroid, BRI1 EMS SUPPRESSOR 1/BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BES1/BZR1) Homolog 3 (BEH3) tham gia điều hòa sinh trưởng, phát triển, cũng như tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng với điều kiện bất lợi. Tuy nhiên, thông tin về chức năng của BEH3 trong phản ứng của thực vật với stress vẫn còn hạn chế. Cà chua là loại cây trồng mang lại hiệu quả kinh tế cao thứ tư trên thế giới và cũng là một trong những cây trồng được sử dụng trong nghiên cứu di truyền. Do thiếu ổn định của đột biến gen *SIBEH3* ở cà chua nên người ta biết rất ít về chức năng của *SIBEH3* trong phản ứng với các stress sinh học và phi sinh học. Ở nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập gen *SIBEH3* từ cà chua 'MicroTom' với kích thước 1501 bp. Phân tích trình tự nucleotide cho thấy độ tương tự 61,4% giữa *AtBEH3* và *SIBEH3* (*Solyc03g005990.3.1*). Hơn nữa, chúng tôi đã xác định được vị trí sgRNA nằm trên exon I của gen *SIBEH3* và tạo ra cấu trúc vector pAMG4723 mang sgRNA chỉnh sửa gen *SIBEH3* bằng phương pháp ghép nối Golden Gate.

*Từ khóa:* Brassinosteroid, Cas9, chỉnh sửa gen, MicroTom, *SIBEH3*.

## MỞ ĐẦU

Brassinosteroid (BR) là các hoóc môn steroid thiết yếu điều chỉnh sự sinh trưởng, phát triển và phản ứng của thực vật với áp lực môi trường. Tín hiệu hoóc môn BR và các yếu tố phiên mã của BR tham gia điều chỉnh phản ứng của BR, sinh tổng hợp BR đã được mô tả (Wang *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2011). Cho đến nay, mối liên kết chéo giữa tín hiệu BR và stress phi sinh học đã được tìm hiểu. Trong đó, các protein liên quan đến tín hiệu BR, bao gồm BES1/BZR1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1/BRASSINAZOLE RESISTANT 1), BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2) và BEH3 (BES1/BZR1 Homolog 3), có thể điều chỉnh phản ứng đầu ra tín hiệu ABA để thích ứng với tình trạng căng thẳng khi mất nước. Gần đây, Nguyen và đồng tác giả (2021) đã báo cáo chức năng về gen tương đồng BES1/BZR1, được chỉ định là BEH3 (đối với BES1/BZR1 Homolog 3) với những mô tả về chức năng sinh lý và phân tử của gen *AtBEH3* như một yếu tố điều chỉnh tiêu cực của stress thâm thấu, và liên kết với BR truyền tín hiệu ở *Arabidopsis thaliana*. Hơn nữa, một số đột biến *AtBEH3* biểu hiện kiểu hình chống chịu hạn (Noguchi *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2015). Tuy nhiên, các cơ chế mà BEH3 tham gia vào quá trình truyền tín hiệu BR để điều chỉnh sự sinh trưởng, phát triển của thực vật và phản ứng với môi trường vẫn chưa được biết rõ.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hệ thống CRISPR/Cas9 có tiềm năng ứng dụng để cải thiện các tính trạng mong muốn của cây. Công cụ này có thể tạo ra các đột biến đích di truyền qua các thế hệ. Ưu điểm nổi bật của công nghệ này đó là tạo ra các đột biến gen đích một cách chính xác mà không cần sự có mặt của gen ngoại (Ricroch *et al.*, 2017). Báo cáo gần đây cho thấy, đột biến gen BEH3 bằng CRISPR/Cas9 đã tạo ra kiểu hình chống chịu hạn tốt ở cây *A. thaliana* và cây đậu tương (Nguyen *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2022). Ở nghiên cứu này, chúng tôi sẽ thiết kế cấu trúc vector chỉnh sửa gen *SIBEH3* bằng CRISPR/Cas9 ở cây cà chua, với mục tiêu tìm kiếm và thiết kế được sgRNA chỉnh sửa gen *SIBEH3* hiệu quả. Đây sẽ là vật liệu quan trọng để tiếp tục chỉnh sửa gen ở cây cà chua, nhằm tạo ra các dòng cà chua chỉnh sửa gen chống chịu với điều kiện biến đổi khí hậu.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Giống cà chua MicroTom, do phòng thí nghiệm nghiên cứu chức năng gen thực vật, Đại học quốc gia Chonnam-Hàn Quốc cung cấp. Hệ thống cấu trúc vector pICSL01009, pICH47751, pICH7732, pICH41766, và pAGM4732 được mua từ hãng Addgene (<https://www.addgene.org/>).

## Tách chiết RNA và phân lập gen *SIBEH3* từ cây cà chua MicroTom

RNA tổng số được phân lập từ 50 mg lá tươi bằng kit RNA plant easy (Qiagen, Đức). cDNA được tổng hợp bằng hệ thống phiên mã ngược GoScript (Promega, Hoa Kỳ). Mỗi khuếch đại đoạn gen *SIBEH3* sử dụng trong PCR bao gồm mỗi xuôi (F: 5'-TCAACTTCAAGCCGATCCAG-3'; và mỗi ngược (R: 5'-CTATCTAGTGCTAGAGTTGC-3'). Phản ứng PCR được bắt đầu ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây, với thời gian kéo dài cuối cùng là 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR-SIBEH3 được kiểm tra trên gel agarose 1%, chạy điện di ở 80 vol, 100 mA trong 30 phút. Sản phẩm PCR được hiển thị trên máy UV-Vis với bước sóng 365 nm.

### Thiết kế RNA định hướng (sgRNA)

Trình tự gRNA đặc hiệu cho gen *SIBEH3* được thiết kế bằng phần mềm CRISPR MultiTargeter (<http://www.multicrispr.net/>), dựa trên mô tả bởi Liang và đồng tác giả (2016). Hàm lượng GC của các gRNA được phân tích bằng phần mềm Genetix 4.0.

### Thiết kế cấu trúc vector mang sgRNA chỉnh sửa gen *SIBEH3*

Cấu trúc vector pAMG4723 mang sgRNA chỉnh sửa gen *SIBEH3* được thực hiện dựa trên phương pháp lắp ráp Golden Gate (Weber *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2014). Cụ thể, các sgRNA được khuếch đại bằng phản ứng oligo phosphorylation 10 µL gồm sgRNA oligo forward 1 µL, sgRNA oligo reverse 1 µL, đệm 10X T4 polynucleotide kinase 1 µL, T4 polynucleotide kinase (NEB) 0,5 µL, nước 6,5 µL. Phản ứng ủ ở 37°C (30 phút), 95°C (5 phút), và giảm nhiệt độ xuống 25°C. Các sgRNA1 và sgRNA2 tiếp tục được ghép nối vào vector pICSL01009::AtU6p để tạo cấu trúc pICSL01009::AtU6p::sgRNA-SIBEH3 theo phản ứng cắt - nối của Weber và đồng tác giả (2011) bao gồm: đệm 10X NEB T4 ligase 1 µL, enzym T4 ligase 0,5 µL, sgRNA plasmid 1 µL, Oligos 1 µL, nước 6,5 µL. Cấu trúc vector này chuyển vào vi khuẩn *E.coli* và kiểm tra kết quả biến nạp bằng phản ứng PCR và cắt enzyme giới hạn *BsaI*.

Tiếp theo, sản phẩm PCR tinh sạch của sgRNA1 và sgRNA2 được ghép nối vào vector tiếp nhận pICH47751 trong phản ứng Golden Gate (Weber *et al.*, 2011) với thành phần gồm có 10X T4 Ligase Buffer 0,5 µL, 10X BSA 0,5 µL, PCR-sgRNA1 (100 ng) hoặc PCR-sgRNA2 (100 ng) 1 µL, pICH47751 (100 ng) 1 µL, pICSL01009\_u6pro (100 ng) 1 µL, *BsaI* 0,5 µL, T4 DNA ligase 0,5 µL, và nước 5 µL. Quá trình ghép nối được thực hiện ở phản ứng ủ ở 37°C (5 phút), 16°C (10 phút), thực hiện trong 10 chu kỳ và tăng nhiệt độ lên 50°C (5 phút) và 80°C (5 phút), lưu giữ ở 10°C. Cấu trúc vector tổ hợp trên được biến nạp vào *E.coli*, nuôi trên môi trường LB để chọn khuẩn lạc trắng và kiểm tra bằng PCR, cắt enzyme giới hạn *BsaI*.

Các vector tái tổ hợp mang promoter U6, gen chọn lọc NPTII, protein Cas9, và cấu trúc vector tái tổ hợp pICH47751-sgRNA1/sgRNA2 được cắt - nối vào vector pAGM4723 với phản ứng ghép nối Golden Gate (Weber *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2014) bao gồm 10X T4 Ligase Buffer 1 µL, pICH47732-NPTII (100 ng) 1 µL, pICH47742-35S:Cas9 (100 ng) 1 µL, pICH47751-sgRNA1 (100 ng) 1 µL, pICH47751-sgRNA2 (100 ng) 1 µL, pICH41766-linker (100 ng) 1 µL, pAGM4723 (100 ng) 1 µL, *Bpil* 0,5 µL, T4 DNA Ligase 0,5 µL, và nước 2 µL. Phản ứng Golden Gate được ủ ở máy ủ nhiệt theo quy trình như trên. Biến nạp cấu trúc vector tái tổ hợp trên vào tế bào *E.coli* và nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung kanamycin 50 µg/ml, và nuôi qua đêm ở 37°C. Chọn lọc khuẩn lạc trắng và kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mỗi đặc hiệu cho sgRNA-SIBEH3, Cas9, và cắt enzyme giới hạn *Bpil*.

Sản phẩm vector tái tổ hợp pAGM4723::Cas9::sgRNA-SIBEH3 (100 ng) được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 khả biến (200 µL), theo phương pháp sốc nhiệt. Chọn lọc vi khuẩn trên môi trường LB chứa 50 mg/L kanamycin. Thu nhận khuẩn lạc màu trắng và kiểm tra khuẩn lạc bằng PCR với cặp mỗi đặc hiệu sgRNA-SIBEH3 và giải trình tự.

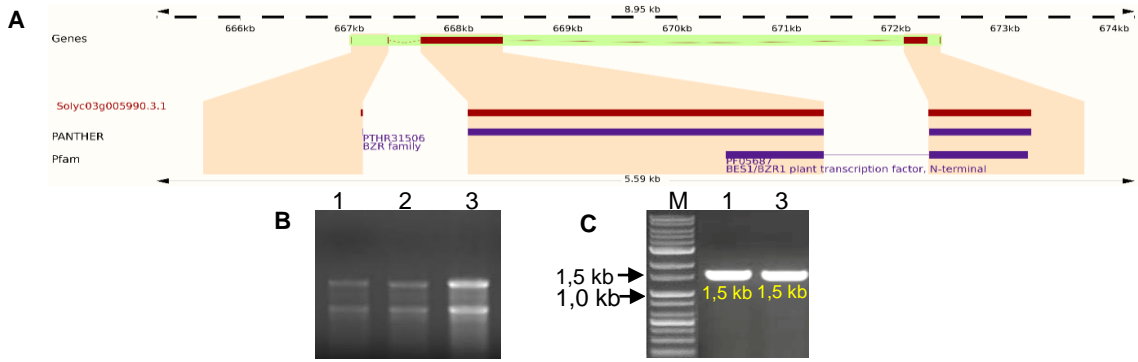
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả xác định trình tự gen *SIBEH3* ở cây cà chua MicroTom

Để tìm kiếm trình tự gen *SIBEH3*, code *Solyc03g005990.3.1* được sử dụng cho tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu về cây cà chua EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/>). Kết quả tìm kiếm cho thấy *Solyc03g005990.3.1* nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số 3, có chứa cả vùng không dịch mã (5'UTR và 3'UTR), các vùng exon và intron. Trong đó, *Solyc03g005990.3.1* có chứa 3 vùng exon và 5 vùng intron. Vùng mã hóa cho gen *Solyc03g005990.3.1* có chiều dài 1501 bp (Hình 1A).

RNA tổng số được tách chiết bằng kit RNA plant easy của Qiagen từ lá cây cà chua và được phân tích trên gel agarose 2%. Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy RNA tổng số thu được đảm bảo độ tinh sạch, RNA vẫn nguyên vẹn (Hình 1B). RNA được sử dụng cho phản ứng tổng hợp cDNA. Kết quả kiểm tra nồng độ cDNA bằng máy Nanodrop cho thấy nồng độ thu được đạt dao động từ 1000 - 1600 ng/µl.

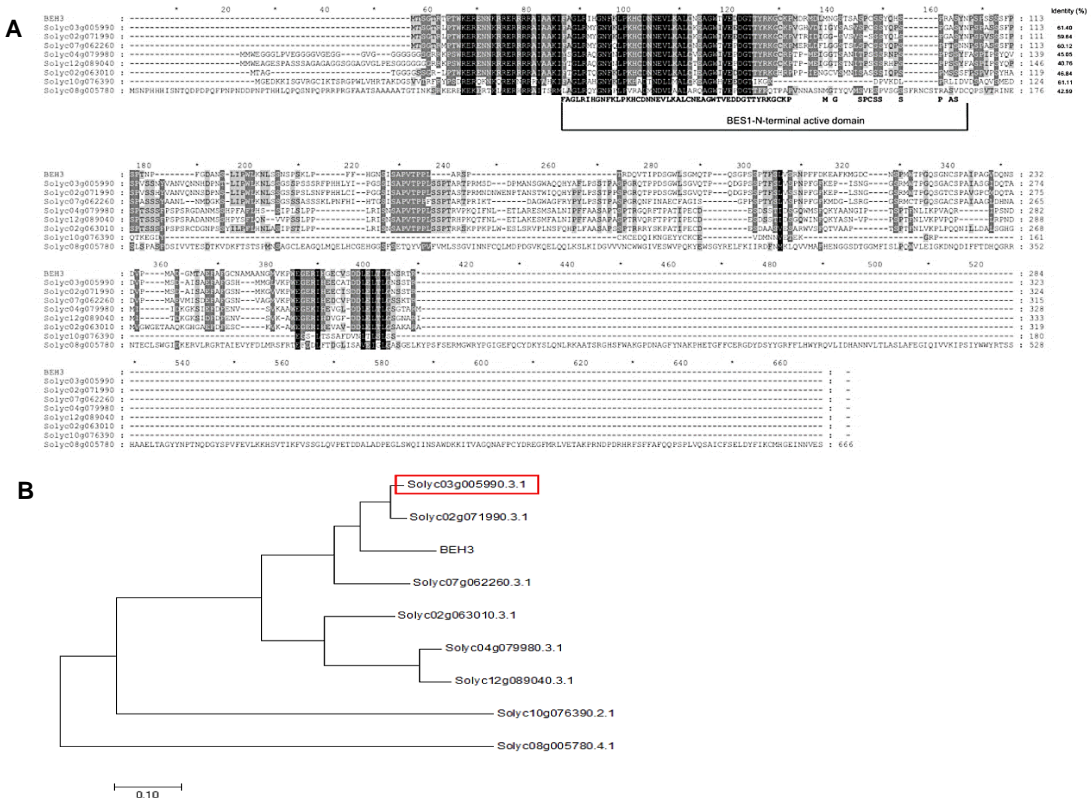
Gen *SIBEH3* được nhân bản bằng PCR với khuôn là DNA của mẫu lá cà chua non (giai đoạn 6 lá), sử dụng cặp mỗi được thiết kế dựa vào trình tự nucleotide của gen *SIBEH3* được công bố trên Genbank. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR chỉ xuất hiện một băng DNA duy nhất có kích thước xấp xỉ 1,5 kb tương ứng với kích thước lý thuyết của đoạn gen *SIBEH3* (1501 bp) (Hình 1C). Như vậy, gen *SIBEH3* mong muốn đã được phân lập thành công từ RNA tổng số của mẫu lá non.



**Hình 1. Kết quả xác định vị trí và phân lập gen SIBEH3**

(A) Vị trí gen SIBEH3 (*Soly03g005990.3.1*). (B) RNA tổng số tách chiết từ mẫu lá. (C) Sản phẩm PCR-SIBEH3 ở giống và chua *MicroTom* điện di trên gel agarose 1%. M: Thang chuẩn 1 kb. 1 và 3 mẫu RNA được PCR với cặp mồi đặc hiệu gen SIBEH3.

Kết quả nhận diện sự tương đồng và xác định vùng axit amin mã hóa protein SIBEH3 chứa một khung đọc mở duy nhất mã hóa protein 666 axit amin. So sánh trình tự axit amin phân tích từ 9 gen cho thấy *Soly03g005990.3.1* có mức độ tương đồng cao 61,4% so với gen *AtBEH3* (*At1g75080*) và cây phân loại (Hình 2A), có trình tự amino acid tương đồng đáng kể với các thành viên đã biết của họ protein BES1-N terminal active domain. Các giá trị tương đồng tổng thể của 40-53% nhận dạng và độ tương tự 40,7%–61,4% đã được phân tích giữa *AtBEH3* và SIBEH3 (*Soly03g005990.3.1*) tương ứng. Sự sắp xếp của *AtBEH3* và BES1-N-terminal active domain suy ra các chuỗi axit amin và mức độ tương đồng của gen SIBEH3 biểu thị bằng cây phân loại (Hình 2B).



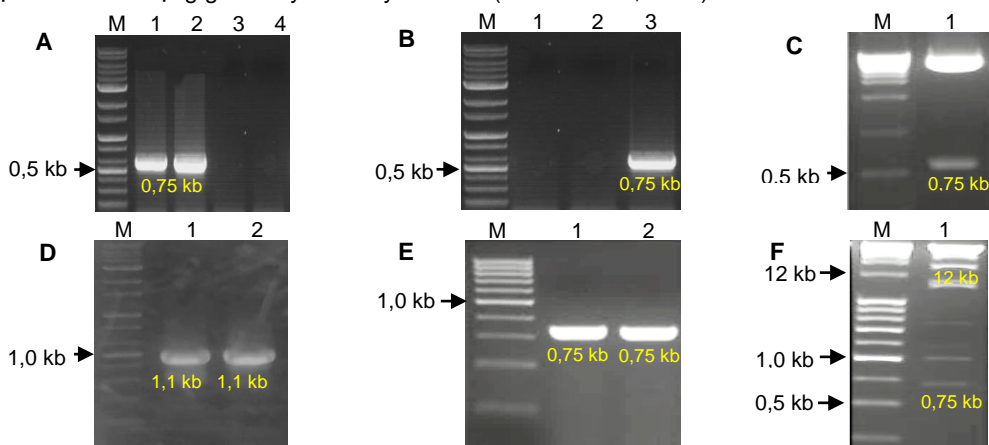
**Hình 2. Sắp xếp các chuỗi axit amin được suy ra có độ dài đầy đủ của các trình tự nucleotide của BEH3 từ các nguồn gốc phát sinh gen khác nhau**

(A) Hiển thị các trình tự nucleotide tương đồng ở *Arabidopsis* BEH3 (*At1g7508*), và một số gen *Soly03g005990.3.1*, *Soly02g071990.3.1*, *Soly07g062260.3.1*, *Soly02g063010.3.1*, *Soly04g079980.3.1*, *Soly12g089040.3.1*, *Soly10g07390.2.1*, và *Soly08g005780.4.1* từ cả chua *MicroTom*. Màu đỏ và màu xám tương ứng biểu thị các axit amin giống hệt và tương tự nhau. Khoảng trống được sử dụng để tối ưu hóa việc căn chỉnh. (B) Cây phát sinh chủng loại mô tả mối quan hệ tương đồng giữa các gen BEH3 ở *Arabidopsis thaliana* và cả chua *MicroTom*. Các số tại các điểm nhánh biểu thị giá trị bootstrap sau 1000 lần lặp.



trùng hợp (PCR) cho thấy hai khuẩn lạc có một băng duy nhất kích thước 0,75 kb (Hình 5A). Sản phẩm PCR của *sgRNA-SIBEH3* trên được tinh sạch và thiết lập phản ứng cắt nối sử dụng enzym giới hạn *Bsal* cho cấu trúc pICSL01009:AtU6p (Spec<sup>R</sup>) và cấu trúc vector mục tiêu ở ghép nối lần 1 pICH47751 (Carb<sup>R</sup>) để tạo thành cấu trúc tái tổ hợp mang trình tự *sgRNA-SIBEH3*. Cấu trúc này sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5α. Kết quả PCR chọn lọc ngẫu nhiên một khuẩn lạc cho thấy có một băng vạch DNA duy nhất xuất hiện, kích thước khoảng 0,75 kb (Hình 5B). Để xác nhận, chúng tôi tiếp tục cắt plasmid bằng enzym giới hạn *Bsal*, kết quả điện di sản phẩm cắt trên gel 1% có hai băng vạch DNA xuất hiện, trong đó có một băng DNA kích thước 0,75 kb của gen *sgRNA-SIBEH3* và băng DNA kích thước 5 kb của vector pICH47751 (Hình 5C).

Ở bước ghép nối lần 2 cấu trúc pICH47751::*sgRNA-SIBEH3* sẽ được tiến hành dung hợp với các tổ hợp cấu trúc khác mang gen chọn lọc kháng sinh kanamycin (pICH47732::NPTII), Cas9 (pICH47742::Cas9), và phần liên kết (pICH41766-linker) cùng với cấu trúc vector pAGM4723 biểu hiện ở cây cà chua, để tạo cấu trúc hoàn chỉnh mang *sgRNA* chỉnh sửa gen *SIBEH3* (Hình 4C). Quá trình cắt nối được tiến hành dưới sự xúc tác của enzyme cắt giới hạn *Bpil* (*BbsI*). Kết quả kiểm tra PCR khuẩn lạc tái tổ hợp cho thấy sự hiện diện của gen Cas9, kích thước 1,1 kb (Hình 5D) và *sgRNA-SIBEH3* (0,75 kb, Hình 5E). Các khuẩn lạc này tiếp tục được kiểm tra bằng phản ứng cắt enzym giới hạn *Bpil*, kết quả xác nhận rằng gen Cas9, *sgRNA-SIBEH3* đã được chèn vào vector pAGM4723 (12 kb) (Hình 5F). Kết quả giải trình tự vector pAGM4723 tái tổ hợp cho thấy *sgRNA1/sgRNA2* đã được chèn ghép nối thành công vào vector pAGM4723 (Hình 6). Quy trình lắp ráp Golden Gate tuân theo các quy tắc thiết kế đơn giản và rõ ràng, đồng thời cho phép cắt nối nhiều mảnh có kích thước khác nhau vào một khung đọc mở (Weber *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2014). Sản phẩm cuối cùng có thể được tích hợp trực tiếp vào hệ thống nhân bản Multisite Gateway<sup>TM</sup> thông qua vector nhệ thể pAGM4723 được sử dụng rộng rãi, mang lại sự linh hoạt hơn khi sử dụng gen chuyển ở cây cà chua (Brooks *et al.*, 2014).



Hình 5. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của sg RNA ở cấu trúc vector pAMG4723

(A) và (B) Khuẩn lạc được kiểm tra PCR một phần đoạn gen *SIBEH3* chứa vị trí *sgRNA* được nối vào vector pICH47751 (ghép nối lần 1). (C) Cắt kiểm tra plasmid bằng enzyme cắt giới hạn *Bsal*. (D) Kết quả kiểm tra PCR khuẩn lạc tái tổ hợp của protein Cas9, kích thước 1,1 kb. Kiểm tra khuẩn lạc bằng phản ứng PCR và cắt enzym giới hạn *Bpil* đối với đoạn gen mang *sgRNA* ghép nối vào vector pAMG4723 (ghép nối lần 2).

taagcacagggATAAGCCCATCAGGGAGCAGcgagaaaaccattaccacttgttactctgaccaacttggcgcgctgcagc  
 ctcaagctactcgcacaccaccatagacagaaaagcgttacacctctacaaaggaggtcctgagcgcacactgattcatcagtcgaattacggggctc  
 tatgaaacaagaatcgacctctcagctcggaggagacagcagggctgacccaagaagaagagggaaggtgtgagcttgaagcagatcgctc  
 aacatttgcaataaaagtcttaagattgaatcctgttgccggtcttcgatgattatcatataatttctgtgaattacgtaagcatgtaataaataacat  
 gtaatgcatgacgttattatgagatgggtttatgattagagtcgccgaattatacatttaacgcgatagaaaacaaaatatagcgcgcaactagg  
 ataaatattcgcgcgctgtcatctatgttactagatcgacgctACTAgaattcagctcggagtgatcaaaagtccacatcgatcaggtgat  
 atagcagcttagttatataatgatagagtcgacatagcgattgTTGGTGATATCAGCACAGTAGTtttagactagaatagc  
 aagttaaataagcgtatcgcttaactgaaaaagtgccaccgagtcgggtctttttctagaccagcttctgtcaaaagtggcattacgctt  
 tacgaattcccattggggagtgatcaaaagtcacatcgatcaggtgatataatagcagcttagttatataatgatagagtcgacatagcgattgTGT  
 TTGAAGTACTGGTCAGGgttttagactagaatagcaagttaaaataaggctagtccttatcaactgaaaaagtgccaccgag  
 tcgggtctttttctagaccagcttctgtacaaagttggcattacgctCAGAGAGGATGCACATGTGACCGagggacacga  
 agtgatccgtttaaactatcagttgttgacaggatatttggcgggtaaacctaaagagaaagagcgtttattagaataatcggatatttaaaagGCG  
 GTGAAAAGGTTTATCCG

Hình 6. Kết quả giải trình tự cấu trúc vector pAMG4723 mang *sgRNAs* chỉnh sửa gen *SIBEH3*.

Vị trí mỗi xuôi khuếch đại vector pAGM4723\_F (màu nền xanh đậm), vị trí mỗi xuôi khuếch đại vector pAGM4723\_R (màu hồng), *sgRNA1* (chữ đậm màu xanh đậm), *sgRNA2* (chữ đậm màu đỏ), linker (màu nền xanh lá cây), ACTA vị trí nhận diện protein cas9.

## KẾT LUẬN

Ở nghiên cứu này, gen *SIBEH3* liên quan đến tín hiệu của hoóc môn BR đã được phân lập và giải trình tự đầy đủ. Vùng trình tự đã phân lập chứa exon I đã được chọn để thiết kế một cấu trúc gRNA phục vụ nghiên cứu chỉnh sửa gen *SIBEH3* bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Hai yếu tố gồm có sgRNA1/sgRNA2 và protein Cas9 đã được ghép nối thành công vào hệ thống vector pAMG4723. Cấu trúc vector này sẽ tiếp tục được chuyển vào cây cà chua để đánh giá hiệu quả chỉnh sửa gen của các sgRNA và làm rõ thêm vai trò của gen *SIBEH3* đối với quá trình điều hòa sinh trưởng, phát triển và đáp ứng stress của cây cà chua ở các nghiên cứu tiếp theo.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ của đề tài cấp Quốc gia theo nhiệm vụ Nghị định thư, mã số NĐT/KR/23/10. Nhóm nghiên cứu cảm ơn sự hỗ trợ và cung cấp vật liệu của giáo sư Cheol Soo Kim, Khoa Nông nghiệp và Khoa học sự sống, Đại học quốc gia Chonnam, Hàn Quốc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9(1): 39.
- Bortesi L, Fischer R (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*, 33(1): 41-52.
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Eck JV (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiol*, 166: 1292-1297.
- Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, Marillonnet S (2014). A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth Biol*, 3: 839-843.
- Feng Y, Yin Y, Fei S (2015). Down-regulation of BdBR11, a putative brassinosteroid receptor gene produces a dwarf phenotype with enhanced drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci*, 234: 163-173.
- Liang G, Zhang H, Lou D, Yu D (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep*, 6: 21451.
- Nguyen TV, Park CR, Lee KH, Lee S, Kim CS (2021). BES1/BZR1 Homolog 3 cooperates with E3 ligase AtRZF1 to regulate osmotic stress and brassinosteroid responses in *Arabidopsis J Exp Bot*, 72: 636-653.
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE (1999). Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol*, 121: 743-752.
- Park CR, Nguyen VT, Min JH, Sang HK, Lim GH, Kim CS. 2022. Isolation and functional characterization of soybean BES1/BZR1 Homolog 3-Like 1 (GmBEH3L1) associated with dehydration sensitivity and brassinosteroid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 11(19): 2565.
- Ricroch A, Clairand P, Harwood W (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg Top Life Sci*, 1:169-182.
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, 2: 505-513.
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermeil S, Yin Y (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 65: 634-646.

## CONSTRUCTION OF THE CRISPR/Cas9 VECTOR EDITING BRASSINOSTEROID HORMONE SIGNALING GENE IN TOMATO

La Van Hien<sup>1,2\*</sup>, Truong Thanh Tung<sup>3</sup>, La Thi Thao<sup>4</sup>, Nguyen Van Tinh<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Life Science, Thai Nguyen University*

<sup>2</sup>*Center of Research Crop for adaptation to Climate change (CRCC), TNU- University of Agriculture and Forestry (TUAF)*

<sup>3</sup>*Institute of Biotechnology and Food Technology, TNU- University of Agriculture and Forestry (TUAF)*

<sup>4</sup>*Vietnam National University of Agriculture*

<sup>5</sup>*Faculty of Basic Science, BMU- University of Pharmacy*

### SUMMARY

The signaling factor of the brassinosteroid hormone, BRI1 EMS SUPPRESSOR 1/BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BES1/BZR1) Homolog 3 (BEH3) regulates plant growth and development, as well as enhancing plant resistance to stress conditions. However, information on the function of BEH3 in plant responses to environments stress is still limited. Tomatoes are the fourth most economically productive crop in worldwide and are also one of the best characterized model plants used in genetic research. Due to the lack of stability of the *SIBEH3* gene mutation in tomato, little is known about the function of *SIBEH3* in tomato response to biotic and abiotic stresses. In this study, we isolated the *SIBEH3* gene from 'MicroTom' tomato with a size of 1501 bp. Nucleotide sequence analysis revealed 61.4% similarity between *AtBEH3* and *SIBEH3* (*Solyc03g005990.3.1*). Furthermore, we identified the sgRNA located on exon I of the *SIBEH3* gene and created the vector construct pAMG4723 carrying the sgRNA mutated *SIBEH3* gene using the Golden Gate assembly method.

*Keywords: Brassinosteroid, Cas9, gene editing, MicroTom, SIBEH3.*

---

\* Author for correspondence: Tel: 0395787043; Email: lavanhien@tuaf.edu.vn