

TẠO DÒNG GEN MÃ HOÁ NHÂN TỔ PHIÊN MÃ *DREB1* ĐIỀU HOÀ CHỐNG CHỊU STRESS PHI SINH HỌC Ở GIỐNG LẠC L14

Trần Linh Anh, Nguyễn Quang Đức Tiến*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Quang Đức Tiến <nqductien@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 05-01-2023; Hoàn thành phản biện: 15-03-2023; Ngày chấp nhận đăng: 27-07-2023)

Tóm tắt. Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày quan trọng của thế giới, cung cấp chính sản lượng dầu thực vật và protein. Lạc được trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, trong đó Châu Á được xem là khu vực có diện tích trồng lạc lớn trên thế giới, chiếm hơn 67% sản lượng lạc toàn cầu. Nhiều nghiên cứu cho thấy việc nhận dạng gen liên quan đến tính chống chịu hạn ở cây trồng có ý nghĩa quan trọng, góp phần hỗ trợ công tác cải thiện giống cho khả năng chống chịu hạn tốt. Nhân tố phiên mã DREB (Dehydration-Responsive Element Binding protein) được chứng minh có vai trò liên quan đến đặc tính chống chịu với các stress hạn ở thực vật. Trong nghiên cứu này, gen mã hoá nhân tố phiên mã *DREB1* ở giống lạc L14 được phân lập, giải và phân tích trình tự. Trình tự cDNA của *DREB1* có chiều dài 1050 nucleotide, mã hoá đoạn polypeptide dài 349 amino acid. Kết quả phân tích cho thấy gen *DREB1* ở giống lạc L14 có sự sai khác 0,48% với giống lạc công bố trên ngân hàng gen. Thông tin trình tự gen *AhL14_DREB1* là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo giúp tăng cường khả năng chịu hạn ở các giống lạc địa phương.

Từ khóa: giống lạc L14, stress phi sinh học, tạo dòng, *DREB1*

Cloning gene encoding transcription factor *DREB1* for regulating abiotic stress of L14 peanut variety

Tran Linh Anh, Nguyen Quang Duc Tien*

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Quang Duc Tien <nqductien@hueuni.edu.vn>

(Received: 05 January 2023; Revised: 15 March 2023; Accepted: 27 July 2023)

Abstract. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an essential short-term industrial crop, producing most of the world's vegetable oil and protein. Peanuts are commonly used as human and animal food, as well as raw materials in a variety of industries. Peanuts are widely grown in tropical and subtropical regions, with Asia being the world's largest peanut-growing area, accounting for more than 67% of the total peanut production. Numerous studies have shown that identifying genes related to drought tolerance in plants is critical for the selection or improvement of drought-tolerant varieties to reduce the risk of damage caused by dry weather conditions. The transcription factor DREB (Dehydration-Responsive Element Binding Protein) has been shown to play a significant role in plant tolerance to drought stress responses. The gene encoding the transcription factor *DREB1* in response to the drought-tolerant peanut variety L14 was isolated, sequenced, and analyzed in this study. The *DREB1*'s cDNA sequence is 1050

nucleotides long and encodes 349 amino acids. The findings of the study reveal that the *DREB1* gene in the L14 peanut variety differs from the published corresponding gene sequence from another peanut by 0.48%. The AhL14_DREB1 gene sequence is the basic information to improve the drought tolerance of local peanut varieties in further studies.

Keywords: peanut variety L14, drought tolerance gene, cloning, *DREB1*

1 Mở đầu

Lạc (*Arachis hypogaea* L.), hay đậu phộng thuộc họ Đậu (Fabaceae), là loại cây nông nghiệp quan trọng của thế giới. Ở Việt nam, cây lạc được trồng phổ biến ở nhiều vùng sinh thái khác nhau như đồng bằng Sông Hồng, Sông Cửu Long, duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên. Lạc được xem là cây trồng khá nhạy cảm với các tác động của các yếu tố bất lợi gây stress phi sinh học [1]. Trong đó, hạn hán là yếu tố phi sinh học, ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đến năng suất cây trồng và giảm chất lượng hạt lạc. Hiện nay, tình trạng biến đổi khí hậu và nóng lên toàn cầu là nguyên nhân gia tăng nguy cơ hạn hán, gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho nền sản xuất nông nghiệp ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam [2]. Một trong những nguyên nhân gây cản trở công tác chọn tạo giống lạc bằng công cụ phân tử là thiếu các thông tin di truyền của các gen và chỉ thị liên kết tính trạng chịu hạn. Trình tự gen liên quan đến tính chịu hạn là thông tin quan trọng hỗ trợ cho công tác cải thiện giống thích ứng với điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Hiện nay, nhiều gen liên quan đến stress hạn đã được phân lập, phân tích đặc tính và biểu hiện ở các giống cây trồng khác nhau nhằm tăng khả năng chống chịu với stress hạn của môi trường [3, 4]. Trong đó, yếu tố phiên mã được xem là nhân tố quan trọng giúp điều hoà sự hoạt động của các gen trong quá trình thích nghi. Cụ thể, yếu tố phiên mã DREB (Dehydration-Responsive Element Binding) được chứng minh có vai trò then chốt giúp chống chịu stress phi sinh học ở thực vật [3, 5]. DREB thuộc họ gen AP2/ERF và là nhóm lớn nhất trong các nhân tố phiên mã ở thực vật, bao gồm năm phân họ lớn: AP2 (APETALA2), RAV (Related to ABI3/VP1), ERF (Ethylene-Responsive

element binding Factor), DREB (Dehydration-Responsive Element Binding proteins) và Soloist [6, 7]. Đặc tính của một số DREB đồng dạng đã được nghiên cứu. Protein DREB chứa miền AP2 (khoảng 59–60 amino acid) có trình tự bám đặc hiệu với yếu tố *cis* (DRE và A/GCCGAC). DREB vừa có kiểu tác động *trans* hoặc có thể liên kết với trình tự *cis* để điều hoà gen mục tiêu hoạt động khi có tín hiệu stress phi sinh học, cải thiện khả năng chịu hạn ở nhiều đối tượng thực vật [8-10]. Hou và cs. chỉ ra rằng trong số các gen đồng dạng (isoform) của DREB, DREB1 đã tăng cường biểu hiện khi xử lý stress hạn ở cây lạc. Điều này gợi ý rằng DREB1 đã tác động trong việc điều hoà khả năng chống chịu với các phản ứng stress phi sinh học ở loài này [3]. Các gen mã hoá DREB1 đã được nghiên cứu phân lập từ nhiều loài thực vật như *Arabidopsis* [1], rau xà lách [10], *Saccharum spontaneum* [11], *Triticum durum* [12], dâu tằm [13], lạc [14], dứa [15] và lúa mỳ [16, 17]. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu cũng đã sử dụng gen *DREB1* để tăng cường khả năng chịu hạn hay chịu mặn cho cây chuyển gen như *Arabidopsis* [1, 18, 19], *Lolium perenne* [20], *Paspalum notatum* [21], lúa [22] và thuốc lá [23]. Các nghiên cứu đều cho thấy protein DREB1 biểu hiện quá mức đã cải thiện hiệu quả khả năng chịu hạn của cây chuyển gen trong điều kiện nhà kính. Hiện nay, việc nghiên cứu tìm hiểu về vai trò của các gen đồng dạng *DREB* đối với tính chịu hạn và chịu mặn ở các giống lạc ở Việt nam vẫn chưa được công bố. Nghiên cứu này tiếp tục nhận dạng gen mã hoá DREB1 ở cây lạc với hy vọng góp phần cung cấp thông tin cần thiết nhằm tăng cường giống cho khả năng chống chịu hạn và năng suất cho giống lạc ở địa phương.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Giống lạc sử dụng trong nghiên cứu là giống L14 của Trung tâm phát triển giống cây trồng công nghệ cao, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Trình tự gen *DREB1*, vector tạo dòng pGEM-T easy (Promega, Đức) và chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10 do phòng thí nghiệm của Viện nghiên cứu Hoạt chất Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

2.2 Phương pháp

Thiết kế môi: Cặp môi dùng để phân lập gen *DREB1* được thiết kế dựa trên các trình tự đã được công bố trên NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và cơ sở dữ liệu của hệ gen lạc (<https://peanutbase.org/>). Sử dụng công cụ Primer3 để thiết kế môi dựa trên vùng bảo tồn bên ngoài CDS của gen. Môi được tổng hợp tại công ty Phù Sa Genomics (Cần Thơ, Việt Nam). Cặp môi L14DREB1_TF: ATTTCCCGGATTTGAAGAGG và L14DREB1_TR: CAGGTCAAGCAGCAAGAAA được kiểm tra tính đặc hiệu bằng Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>) và sản phẩm được khuếch đại dự kiến có kích thước ~1,5 kb.

Tách chiết RNA tổng số: RNA tổng số của giống lạc L14 (mô rễ) được tách chiết thăm dò bằng các phương pháp khác nhau bao gồm: phương pháp CTAB [24], Trizol [25], Kit GeneJET Plant RNA Purification và Kit EZ-10 Spin Column Plant RNA Extraction (Thermo Scientific, Mỹ). Đối với phương pháp CTAB, mô rễ (100 mg) được nghiền trong nitor lỏng và chuyển vào ống Eppendorf 1,5 mL chứa CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8) đã được làm ấm. Vortex đều hỗn hợp dung dịch và ủ ở 65 °C trong 15 phút. Sau khi ly tâm 10 phút ở tốc độ 12000 vòng/phút, dịch nổi được chuyển sang ống Eppendorf mới. Bổ sung cùng một thể tích chloroform và ủ 10 phút trong đá. Dịch nổi thu

được sau ly tâm được bổ sung thêm 1/3 thể tích 8 M LiCl và ủ ở 4 °C qua đêm. Thu kết tủa bằng ly tâm và rửa lại bằng ethanol 70% trước khi hoà tan bằng 30 µL nước cất đã xử lý với 0,1% DEPC. Sản phẩm RNA tổng số được bảo quản ở -75 °C. Nồng độ và chất lượng được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ và điện di agarose gel. Đối với phương pháp sử dụng Trizol, mẫu rễ lạc L14 (100 mg) được nghiền mịn trong nitor lỏng và chuyển vào ống Eppendorf 1,5 mL chứa 1 mL Trizol (Sigma-Aldrich, USA). Vortex dung dịch trước khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Thu dịch nổi bằng ly tâm và bổ sung thêm 200 µL chloroform, 50 µL 2 M sodium acetate pH 4,2, 15 µL beta-mercaptoethanol, 10 µL 1% PVP và hỗn hợp dung dịch được trộn đều và ủ trong ba phút. Ly tâm thu dịch nổi và bổ sung thể tích tương đương isopropanol và 200 µL 3 M sodium acetate và sau đó ủ ở -20 °C trong 2 giờ. Thu kết tủa bằng ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C và rửa bằng 75% ethanol. Sấy khô tủa ở nhiệt độ phòng trước khi hoà tan vào 30 µL nước cất đã xử lý với 0,1% DEPC. Phương pháp Kit GeneJET Plant RNA Purification và Kit EZ-10 Spin Column Plant RNA Extraction được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tạo dòng gen và phân tích trình tự: Đoạn gen *DREB1* được phân lập bằng phương pháp RT-PCR dựa trên khuôn mẫu RNA tổng số với cặp môi đặc hiệu. Sản phẩm RT-PCR sau khuếch đại được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific, Mỹ) và gắn vào vector tạo dòng pGEM-T easy. Phản ứng gắn được tiến hành qua đêm ở 4 °C và được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10. Các thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB agar, bổ sung 50 mg·L⁻¹ ampicillin. Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* mang DNA plasmid tái tổ hợp pGEM-T easy được sàng lọc bằng PCR. Sau khi nhân dòng thành công vào vector pGEM-T easy, chúng tôi xác nhận trình tự DNA chính xác của gen nghiên cứu bằng phương pháp cải tiến BigDye® Terminator v3.1 của công ty

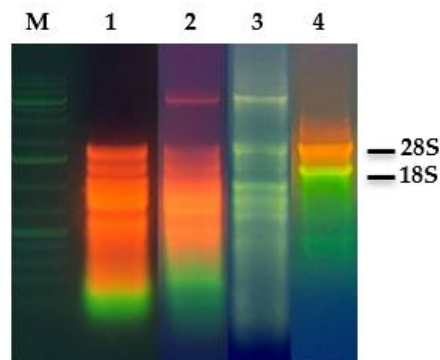
First BASE, Malaysia, với môi T7 và SP6. Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm ApE plasmid editor (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>). Ngoài ra, chức năng protein DREB1 và sự định vị của chúng ở trong tế bào được phân tích lần lượt bằng Deeploc 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>) và InterProScan (ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/). Bên cạnh đó, cấu trúc bậc hai của protein cũng được dự đoán bằng PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số của mẫu rễ giống lạc L14 được tách chiết bằng các phương pháp khác nhau và phân tích trên gel agarose 1%, bổ sung 0,1% DEPC (Hình 1).

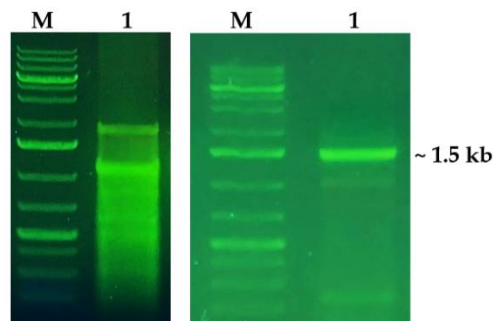
Kết quả cho thấy RNA tổng số được tách chiết có nồng độ và chất lượng khác nhau giữa các phương pháp. Trong đó, phương pháp sử dụng GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ) cho kết quả tốt nhất. Các tiểu phần RNA sắc nét, ít bị đứt gãy, có nồng độ cao và hầu như không bị nhiễm DNA tổng số. Phương pháp tách chiết RNA bằng Trizol cũng cho kết quả khá tốt. Nồng độ RNA tổng số thu được đạt mức cao, không bị nhiễm DNA tổng số; số tiểu phần ribosome nhiều hơn; các băng tiểu phần khá sắc nét, nhưng RNA bị đứt gãy. Đối với các phương pháp tách chiết khác như CTAB và sử dụng EZ-10 Spin Column Plant RNA Extraction Mini Prep Kit, nồng độ RNA tổng số thu được thấp hơn, bị đứt gãy và đều xuất hiện một lượng đáng kể DNA tổng số. Do đó, phương pháp tách chiết RNA tổng số bằng kit GeneJET Plant RNA Purification hoặc phương pháp Trizol cải tiến được khuyến cáo sử dụng cho các nghiên cứu tách chiết RNA tổng số ở lạc.



Hình 2. Kết quả tách chiết RNA tổng số
M: DNA marker 1 kb plus ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1: Phương pháp Trizol; 2: Phương pháp CTAB; 3: EZ-10 Spin Column Plant RNA Extraction Mini Prep Kit; 4: GeneJET Plant RNA Extraction Mini Prep Kit

3.2 Tạo dòng gen

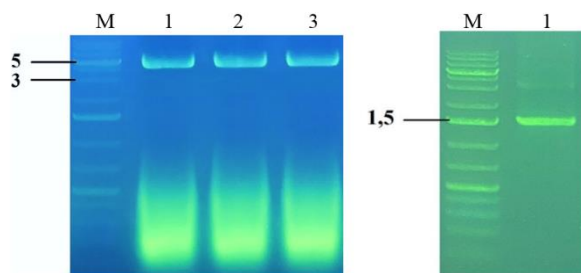
Tổng hợp gen bằng RT-PCR: Trên cơ sở trình tự DNA của các gen nghiên cứu thu thập từ cơ sở dữ liệu chuyên biệt (<https://www.peanutbase.org/>), chúng tôi thiết kế cặp mồi đặc hiệu bằng Primer3 để phân lập gen bằng phương pháp RT-PCR (Hình 2). RNA tổng số phân lập với hai tiểu phần 18S và 28S ít bị đứt gãy với nồng độ đảm bảo cho phản ứng tổng hợp cDNA (Hình 2A). Sau khi loại bỏ DNA, RNA tổng số (1 µg) được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng tổng hợp gen *DREB1* bằng phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm khuếch đại cDNA phân tích trên gel agarose 1% cho thấy băng cDNA có mức



Hình 1. Kết quả khuếch đại cDNA bằng RT-PCR; (A) RNA tổng số và (B) sản phẩm RT-PCR của gen *DREB1*; M: DNA marker 1kb plus ladder (Thermo Scientific, Mỹ)

độ đặc hiệu khá tốt, với kích thước xấp xỉ 1,5 kb. Kết quả cũng hoàn toàn phù hợp với kích thước đoạn DNA mang gen *DREB1* dự đoán theo tính toán bằng lý thuyết (Hình 2B).

Tạo dòng gen: Sản phẩm khuếch đại cDNA của *DREB1* được tinh sạch bằng phương pháp sử dụng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm tinh sạch trên gel agarose 1% cho thấy băng DNA tinh sạch có kích thước dài xấp xỉ 1,5 kb với mức độ tinh sạch và nồng độ cao. Sản phẩm RT-PCR sau khi tinh sạch được tạo dòng vào vector pGEM-T easy (Promega, Mỹ).

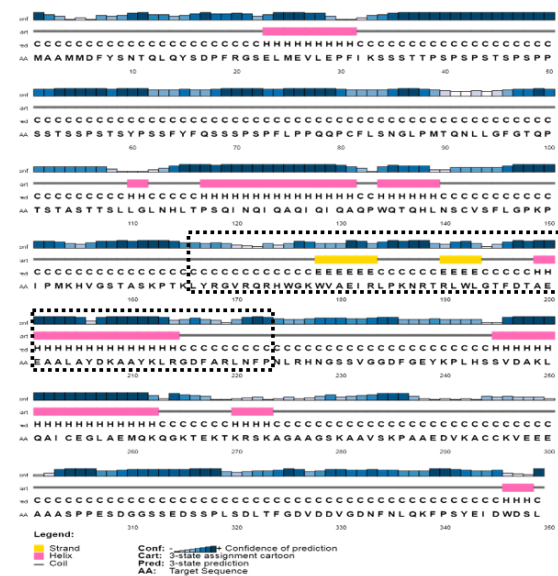


Hình 4. Kết quả tạo dòng gen *DREB1* vào pGEM-T easy vector. (A) DNA plasmid và (B) sản phẩm PCR của gen *DREB1*. M: DNA marker 1 kb plus ladder (Thermo Scientific, Mỹ)

Các dòng khuẩn lạc tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB agar chứa 50 mg/L ampicillin. Sự có mặt của gen trong vector được xác nhận bằng phương pháp PCR với mỗi đặc hiệu dựa trên khuôn mẫu DNA plasmid của chúng. DNA plasmid phân tích trên gel agarose 1% (Hình 3A) cho thấy đều xuất hiện băng DNA khoảng 4,5 kb, phù hợp với kích thước của vector tái tổ hợp (pGEM T-easy: ~3 kb, đoạn DNA: ~1,5 kb). Kết quả sàng lọc bằng PCR dựa trên khuôn mẫu DNA plasmid của thể biến nạp cho thấy xuất hiện băng DNA đặc hiệu và có kích thước tương ứng với kích thước của đoạn gen *DREB1* (Hình 3B). Kết quả trên cho thấy *DREB1* đã được tạo dòng thành công vào vector pGEM-T easy. Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10 mang plasmid tái tổ hợp chứa gen *AhL14_DREB1* được bảo quản trong glycerol ở -20°C .

3.3 Giải và phân tích trình tự

Sau khi nhân dòng thành công đoạn gen *DREB1* vào vector pGEM-T easy, chúng tôi giải trình tự cDNA chính xác của gen bằng phương pháp cải tiến BigDye® Terminator v.3.1 của công ty First BASE (Malaysia). Kết quả phân tích trình tự gen *DREB1* có chiều dài 1.050 nucleotide mã hoá cho 349 axit amin (aa) với khối lượng phân tử 37,79 kDa (Hình 4). Kết quả phân tích pfam (<http://smart.embl.de/>) và motif scan (<https://myhits.sib.swiss/>) trình tự acid amine cho thấy *DREB1* chứa miền AP2 của họ AP2/ERF tại vị trí aa 166 đến 229 (Hình 4) với motif đặc trưng LYRGVQRHWGKWVAEIRLPKNRTRLWLGTFTAEAAALAYDKAAYKLRGDFARLNFP (Hình 5). Đây là miền liên kết DNA quan trọng của *DREB1*, giúp điều hoà hoạt động của các gen đáp ứng các dạng stress phi sinh học khác nhau. Ngoài ra, kết quả phân tích bằng Deeploc cho thấy *DREB1* định vị ở nhân tế bào với với mức dự đoán xác suất cao (86,75%) (Bảng 1), đây là đặc điểm chung của nhân tố phiên mã DREB. Bên cạnh đó, phân tích chức năng protein bằng InterProScan cho thấy *DREB1* có hai chức năng đặc trưng của các nhân tố



Hình 3. Cấu trúc bậc hai của AhL14_DREB1. Xoắn alpha (hồng), xoắn beta (vàng). Miền AP2/ERF của *DREB1* (khung viền chấm)

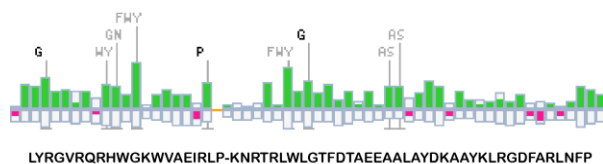
phiên mã liên quan đến quá trình sinh học (điều hoà phiên mã khuôn mẫu DNA: GO:0006355) và chức năng phân tử (hoạt động của yếu tố phiên mã gắn DNA: GO:0003700 và liên kết DNA: GO:0003677). Gen *DREB1* của giống lạc L14 được đặt tên là *AhL14_DREB1*.

Kết quả phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự *DREB1* giữa các loài khác nhau cho thấy *DREB1* của giống lạc L14 giống 99,52% với với gen tương ứng ở giống lạc Yueyou 7 (KU143745) [1] với giá trị bootstrap tuyệt đối (Hình 6).

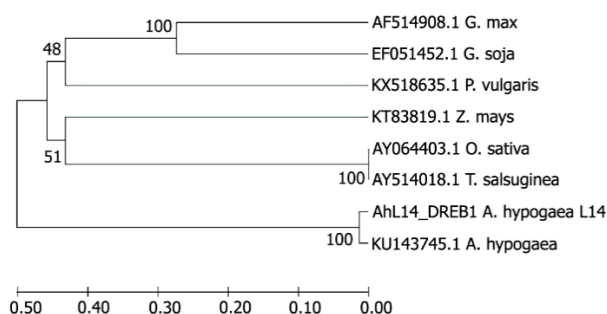
Phân tích vị trí gen trên hệ gen lạc cho thấy *AhL14_DREB1* nằm ở vị trí nucleotide từ 12681115 đến 12682164 của nhiễm sắc thể số 8 (araly.Tifrunner.gnm2.Arahy.08) trong hệ gen (Hình 7 A, B).

Bảng 1. Dự đoán sự định vị của DREB1 ở tế bào

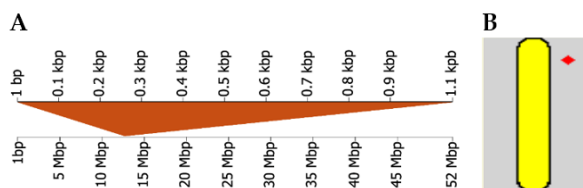
Tế bào chất	Nhân	Ngoại bào	Màng tế bào	Ti thể
0,3248	0,8675	0,0147	0,0854	0,1404
Lạp thể	Lưới nội chất	Lysosome /không bào	Thể Golgi	Peroxisome
0,0217	0,0572	0,0581	0,0243	0,022



Hình 5. Miền AP2/ERF của *AhL14_DREB1* với trình tự motif đặc trưng



Hình 6. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự *DREB1* giữa các loài khác nhau



Hình 7. Vị trí gen *AhL14_DREB1* ở hệ gen (A) và trên nhiễm sắc thể số 8 (B) của Lạc

4 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập và nhận diện thành công trình tự cDNA của gen *AhL14_DREB1* mã hoá dehydration-responsive element-binding 1 ở giống lạc L14. Thông tin trình tự gen *AhL14_DREB1* liên quan đến tính chống chịu stress phi sinh học là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo về phân tích hoạt động phiên mã của gen và hỗ trợ cải thiện di truyền để tăng cường khả năng chịu hạn ở các giống lạc địa phương.

Thông tin tài trợ: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ Cấp Bộ (mã số: CT-2021-01-DHH-4).

Tài liệu tham khảo

- Zhang B, Su L, Hu B, Li L. Expression of AHDREB1, an AP2/ERF transcription factor gene from Peanut, is affected by histone acetylation and increases abscisic acid sensitivity and tolerance to osmotic stress in Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(5):1441.
- Vien TD. Climate change and its impact on agriculture in Vietnam. Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 2011;17(1):17-21.
- Hou L, Liu W, Li Z, Huang C, Fang XL, Wang Q, Liu X. Identification and expression analysis of genes responsive to drought stress in Peanut. Russian Journal of Plant Physiology. 2014;61(6):842-852.

4. Oanh PT, Thuỷ VTT, Tâm NT, Mậu CH. Sự sai khác về trình tự nucleotide trong gen cystatin ở một số dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo của giống lạc L18. Tạp chí Khoa học & Công nghệ. 2009;85(09)1:133-141.
5. Riechmann JL, Meyerowitz EM. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biol Chem. 1998;379:633-646.
6. Cui M, Haider MS, Chai P, Guo J, Du P, Li H, et al. Genome-Wide Identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factor related to drought stress in cultivated Peanut (*Arachis hypogaea* L.). Frontiers in Genetics. 2021;12.
7. Dang PM, Chen CY, Holbrook CC. Identification of drought-induced transcription factors in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). Journal of Molecular Biochemistry. 2012;1(3).
8. Ji AJ, Luo HM, Xu ZC, Zhang X, Zhu YJ, Liao BS, et al. Genome-Wide Identification of the AP2/ERF gene family involved in active constituent biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. The Plant Genome. 2016;9(2).
9. Zhang M, Liu W, Bi Y, Wang Z. Isolation and identification of PNDREB1: a new DREB transcription factor from Peanut (*Arachis hypogaea* L.). Acta Agronomica Sinica. 2009;35(11):1973-1980.
10. Park S, Shi A, Mou B. Genome-wide identification and expression analysis of the CBF/DREB1 gene family in Lettuce. Scientific reports. 2020;10(1):1-14.
11. Li Z, Wang G, Liu X, Wang Z, Zhang M, Zhang J. Genome-wide identification and expression profiling of DREB genes in *Saccharum spontaneum*. BMC genomics. 2021;22(1):1-15.
12. Latini A, Rasi C, Sperandei M, Cantale C, Iannetta M, Dettori M, et al. Identification of a DREB-related gene in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions. Annals of Applied Biology. 2007;150(2):187-195.
13. Liu XQ, Zhu JJ, Wei CJ, Guo Q, Bian CK, Xiang ZH, et al. Genome-wide identification and characterization of the DREB transcription factor gene family in Mulberry. Biologia Plantarum. 2015;59(2):253-265.
14. Yang W, Liu XD, Chi XJ, Wu CA, Li YZ, Song LL, et al. Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. Planta. 2011;233(2):219-229.
15. Chai M, Cheng H, Yan M, Priyadarshani SVGN, Zhang M, He Q, et al. Identification and expression analysis of the DREB transcription factor family in Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). PeerJ. 2020;8:e9006.
16. Hassan S, Berk K, Aronsson H. Evolution and identification of DREB transcription factors in the wheat genome: modeling, docking and simulation of DREB proteins associated with salt stress. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2022;40(16):7191-7204.
17. Niu X, Luo T, Zhao H, Su Y, Ji W, Li H. Identification of wheat DREB genes and functional characterization of TaDREB3 in response to abiotic stresses. Gene. 2020;740:144514.
18. Tong Z, Hong B, Yang Y, Li Q, Ma N, Ma C, et al. Overexpression of two chrysanthemum *DgDREB1* group genes causing delayed flowering or dwarfism in Arabidopsis. Plant Molecular Biology. 2009;71(1):115-129.
19. Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. Plant Molecular Biology. 2008;67(6):589-602.

20. Li X, Cheng X, Liu J, Zeng H, Han L, Tang W. Heterologous expression of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 gene enhances drought and freezing tolerance in transgenic *Lolium perenne* plants. *Plant Biotechnology Reports*. 2011;5(1):61-69.
21. James VA, Neibaur I, Altpeter F. Stress inducible expression of the DREB1A transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge) enhances abiotic stress tolerance. *Transgenic Research*. 2008;17(1):93-104.
22. Chen JQ, Meng XP, Zhang Y, Xia M, Wang XP. Over-expression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnology letters*. 2008;30(12):2191-2198.
23. Gutha LR, Reddy AR. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*. 2008;68(6):533-555.
24. Yin D, Liu H, Zhang X, Cui D. A protocol for extraction of high-quality RNA and DNA from peanut plant tissues. *Molecular biotechnology*. 2011;49:187-191.
25. Banjara M, Zhu L, Shen G, Payton P, Zhang H. Expression of an Arabidopsis sodium/proton antiporter gene (AtNHX1) in peanut to improve salt tolerance. *Plant biotechnology reports*. 2012;6:59-67.