

## PHÂN TÍCH GEN MÃ HÓA PROTEIN GIÀU METHIONINE TRÊN CÂY *Arabidopsis thaliana* TRONG ĐIỀU KIỆN BẤT LỢI

Chu Đức Hà<sup>1</sup>, Lê Thị Ngọc Quỳnh<sup>1,2</sup>, Phạm Thị Lý Thu<sup>1</sup>,  
Nguyễn Quang Huy<sup>2</sup>, Lê Tiến Dũng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam \*research@letiendung.info

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

**TÓM TẮT:** Methionine (Met) có vai trò quan trọng trong tế bào thực vật. Sự ôxi hóa Met trên phân tử protein gây ra bởi gốc oxy hóa tự do có thể gây rối loạn quá trình trao đổi chất, dẫn truyền tín hiệu, làm suy yếu hoặc gây chết tế bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm được 121 protein giàu Met (AtMRP) từ cơ sở dữ liệu genome của cây *Arabidopsis thaliana*, trong đó, khoảng 50% số gen là chưa được xác định chức năng. Dựa trên các nghiên cứu trước đây về biểu hiện của gen trong điều kiện bất lợi, chúng tôi đã xác định được 23 và 16 gen *AtMRP* có mức độ phiên mã tăng và giảm tương ứng trong điều kiện hạn, 11 và 17 gen có mức biểu hiện tăng và giảm khi xử lý mặn. Trong số các gen này, có 10 đáp ứng gen phiên mã với cả hạn và mặn. Gen AT4G33467 đáp ứng mạnh nhất và có độ biểu hiện trong điều kiện hạn cao gấp 337,5 lần so với ở điều kiện thường. Gen bị kìm hãm phiên mã mạnh nhất là AT3G55240, giảm tương ứng 60,3 và 26,9 lần khi xử lý hạn và mặn. Cây *Arabidopsis* RBC1 siêu biểu hiện gen AT3G55240 mặn cảm hơn so với cây kiểu dại trong điều kiện mặn (NaCl 175 mM). Đây là những bằng chứng đầu tiên và quan trọng về vai trò của gen mã hóa MRP trong đáp ứng với điều kiện bất lợi ở thực vật, mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng các gen này trong chọn tạo giống bằng công nghệ sinh học.

*Từ khóa:* *Arabidopsis thaliana*, độ mặn, khô hạn, methionine, protein giàu methionine.

### MỞ ĐẦU

Thực vật là nguồn cung cấp protein chủ yếu cho toàn bộ sinh giới. Protein thực vật được cấu thành từ hơn 20 loại axit amin, trong đó quan trọng nhất là một số axit amin không thể thay thế. Methionine (Met) là một axit amin cần thiết, có vai trò quan trọng trong đời sống sinh giới nói chung, là tiền chất tạo ra một số hợp chất trao đổi thứ cấp thiết yếu trong tế bào. Mã hóa cho bộ ba mở đầu AUG, Met là tín hiệu bắt đầu cho quá trình sinh tổng hợp chuỗi polypeptide. Met điều hòa trao đổi chất thông qua dẫn xuất S-Adenosyl Methionine (SAM), là phân tử cung cấp nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) cho các phản ứng diễn ra trong tế bào. SAM cũng tham gia vào chu trình sinh tổng hợp ethylene [36], vitamin B<sub>1</sub> và một số hợp chất liên quan đến quá trình tăng trưởng và biệt hóa tế bào, apoptosis, cân bằng nội môi như polyamine, spermidine, spermine [13, 19]. Tuy là một axit amin thiết yếu, nhưng hàm lượng Met ở một số cây trồng quan trọng lại rất thấp, điển hình như ở khoai tây (*Solanum tuberosum*) có hàm lượng Met đạt 30 mg/100 gam, trong khi lúa (*Oryza*

*sativa*), lúa mì (*Triticum* spp.), ngô (*Zea mays*), và đậu tương (*Glycine max*) cũng chỉ chiếm tương ứng là 170 - 220 - 190 - 580 mg trên mỗi 100 gam [28]. Vì thế, nghiên cứu về vai trò của Met trên thực vật luôn nhận được sự quan tâm trên thế giới, nhất là ở các nước đang phát triển, nơi có tình trạng mất cân bằng dinh dưỡng xảy ra rất nghiêm trọng [39].

Cây trồng luôn chịu tác động từ các yếu tố bất lợi của môi trường, đặc biệt là yếu tố hạn và mặn gây ra bởi tình trạng biến đổi khí hậu, từ đó ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển và làm sụt giảm năng suất. Bản chất của quá trình này là sự mất cân bằng trong quá trình sản sinh và loại bỏ gốc ôxi hóa tự do chứa ôxi (Reactive Oxygen Species, ROS) trong tế bào. Tác động của ROS làm thay đổi cấu trúc dẫn đến mất chức năng của các chất phân tử lớn như DNA, RNA, lipid và protein, từ đó gây rối loạn quá trình trao đổi chất nội bào, thậm chí có thể gây chết tế bào [9, 18]. Met là một  $\alpha$ -axit amin chứa lưu huỳnh đặc biệt nhạy cảm với ROS do có gốc ôxi nguyên tử, chúng dễ dàng bị ôxi hóa thành dạng MetO (Methionine Sulfoxide) và

cuối cùng thành dạng MetO<sub>2</sub> (Methionine Sulfone) [15, 33]. Sự ôxi hóa Met, đặc biệt là Met liên kết trên phân tử protein gây ra bởi ROS dẫn đến những hậu quả nghiêm trọng cho tế bào [17]. Kết quả của sự thay đổi cấu trúc của phân tử protein chứa Met, nhất là nhóm protein giàu Met (Met-rich protein, MRP) là thay đổi cấu hình của enzyme, gây rối loạn các phản ứng sinh hóa nội bào, đẩy nhanh quá trình lão hóa hoặc giảm sức sống cho cây trồng [32]. Xinwen et al (2012) [34] đã xác định được 7 MRP thiếu Cys (0-2% Cys) trên nhiều đối tượng, qua đó đánh giá mức độ của chúng với các tác nhân ôxi hóa. Trước đó, Takahashi et al. (2011) [30] cũng đã nghiên cứu vai trò của một trong số MRP quan trọng liên quan đến chuỗi dẫn truyền tín hiệu trong tế bào là calmodulin thông qua *Arabidopsis thaliana*.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định các gen mã hóa MRP trên cây *Arabidopsis thaliana* và vai trò của nó trong việc đáp ứng của cây trồng với điều kiện bất lợi của môi trường. Bằng các phương pháp tiếp cận tin sinh học, chúng tôi tiến hành (1) tìm kiếm và phân tích gen mã hóa MRP trên cây *Arabidopsis thaliana*, (2) đánh giá mức độ biểu hiện của gen mã hóa MRP trong điều kiện bất lợi, (3) từ các kết quả đó dự đoán gen mã hóa MRP tham gia vào đáp ứng với điều kiện bất lợi, và cuối cùng, (4) sử dụng phương pháp thực nghiệm để đánh giá tính kháng mặn của một gen được xác định là quan trọng dựa trên khai thác cơ sở dữ liệu. Kết quả này sẽ cung cấp những thông tin quan trọng phục vụ nghiên cứu chức năng gen liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi ở cây trồng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sau khi tìm được các gen mã hóa MRP đáp ứng phiên mã với điều kiện bất lợi, chúng tôi tìm các dòng *Arabidopsis* đột biến mất chức năng (knock-out mutant) hoặc biểu hiện quá mức các gen này từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Tài nguyên *Arabidopsis* (ABRC, Ohio, Hoa Kỳ) hoặc Trung tâm Tài nguyên sinh học RIKEN (RIKEN Bioresource Center, Nhật Bản). Hạt *Arabidopsis* kiểu dại, chủng Columbia (Col-0) và dòng siêu biểu hiện gen mã hóa MRP sử dụng trong nghiên cứu này được tìm thấy trong

“thư viện FOX” được cung cấp bởi Trung tâm Tài nguyên sinh học RIKEN.

Môi trường nuôi cấy là khoáng cơ bản Murashige & Skoog (Duchefa, Hà Lan), bổ sung 0,7% agar. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,5 trước khi khử trùng. Kháng sinh được sử dụng để chọn lọc hạt chuyển gen là hygromycin B (Sigma, Hoa Kỳ).

### Phương pháp tìm kiếm và chú giải MRP

Trình tự polypeptide của *Arabidopsis thaliana* lấy từ cơ sở dữ liệu Phytozome v9.0 [10] được sử dụng để tìm kiếm tất cả các protein có ít nhất 95 axit amin và chứa nhiều hơn 6% Met bằng một đoạn mã chạy trên nền java.

Trình tự polypeptide của gen mã hóa MRP với định dạng fasta được đưa vào phần mềm MAPMAN (<http://mapman.gabipd.org>), sử dụng bộ chú giải của Affymetrix dành cho *Arabidopsis* theo dữ liệu TAIR bản 9.0 [31].

### Phương pháp dự đoán vị trí của MRP trong tế bào

Tập fasta chứa trình tự của MRP trên *Arabidopsis thaliana* được sử dụng để khai thác trên 3 cơ sở dữ liệu trực tuyến bao gồm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), pSORT (<http://www.psort.org/>), và CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) [8, 14, 37].

### Phương pháp phân tích dữ liệu microarray

Dữ liệu biểu hiện gen trong điều kiện thường và bất lợi được thu thập từ cơ sở dữ liệu GEO của NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) [2, 7]. Số liệu từ các nghiên cứu trước đây của chúng tôi [23, 24] được tải xuống và phân tích bằng MS EXCEL.

### Phương pháp đánh giá mức độ đáp ứng của cây chuyển gen trong điều kiện mặn

Hạt *Arabidopsis* chuyển gen (do Trung tâm Tài nguyên sinh học RIKEN cung cấp) được trồng trên môi trường ½ MS agar có bổ sung hygromycine ở nồng độ 15 mg/l để chọn lọc.

Để thử nghiệm tính kháng mặn, cây chuyển gen và cây kiểu dại được nảy mầm trên môi trường ½ MS. Cây non 12 ngày tuổi sau đó được chuyển sang môi trường ½ MS agar bổ

sung muối NaCl ở nồng độ 175 mM [38]. Cây sống sót trên môi trường muối sẽ được đếm từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7.

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ngẫu nhiên 3 lần, mỗi lần gieo ít nhất 15 hạt/đĩa để đảm bảo độ tin cậy cho quan sát. Các mẫu được đặt trong phòng nuôi cây với điều kiện 16h sáng/8h tối, nhiệt độ 22±2°C.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tìm kiếm và mô tả gen mã hóa protein giàu Met trên *Arabidopsis thaliana*

Trong nghiên cứu này, tất cả những gen mã

hóa cho protein có kích thước lớn hơn 95 gốc axit amin và chứa hàm lượng Met chiếm ít nhất 6% trích xuất từ cơ sở dữ liệu Phytozome v9.0. Qua chọn lọc, 121 gen mã hóa cho MRP (*AtMRP*) đã được phát hiện, các gen này phân bố rải rác trên toàn bộ genome của *Arabidopsis thaliana*. Trong số đó, có 43 gen mã hóa cho MRP có hàm lượng Met lớn hơn 7%, đặc biệt có 2 gen là AT4G16980 và AT1G33820 mã hóa cho protein có kích thước tương ứng là 164 và 182 axit amin, chứa 15,95% và 16,02% Met. 121 gen *AtMRP* ứng viên tiếp tục được phân tích chức năng gen thông qua công cụ MAPMAN.

Bảng 1. Gen mã hóa MRP trên cây *Arabidopsis thaliana*

Mô tả chức năng gen	<i>AtMRPs</i>	%
Mang kim loại	2	1,80
Liên quan đến stress	1	0,90
Hình thành RNA	4	3,60
Phiên mã RNA	20	18,01
Biến đổi protein	12	10,81
Con đường tín hiệu (Ca <sup>2+</sup> )	6	5,40
Chu kỳ tế bào	3	2,70
Phát triển	1	0,90
Vận chuyển (kim loại)	6	5,40
Chưa xác định - Chưa được biết đến	56	50,45

Một gen có thể được phân loại vào nhiều hơn một nhóm chức năng.

MAPMAN là một công cụ cho phép chú giải chức năng gen. Theo Thimm et al. (2004) [31], MAPMAN xác định chức năng của gen có thể tham gia vào một phần của quá trình trao đổi chất, hoặc có chức năng cụ thể (như tổng hợp protein), đáp ứng sinh học (như gen tham gia vào trao đổi chất và/hoặc đáp ứng với hormone), hoặc mã hóa cho các họ enzyme mà chức năng của chúng chưa rõ. Đây được đánh giá là ứng dụng rất hữu ích, cho phép phân loại gen theo nhóm chức năng. Kết quả cho thấy, khoảng 50% gen *AtMRP* chưa rõ hoặc chưa xác định được chức năng trong tế bào. Số còn lại đóng vai trò quan trọng trong tế bào, chúng tham gia vào hầu hết các quá trình xảy ra nội bào. Trong nghiên cứu này, đã xác định được 9 nhóm chức năng, ở đây hiểu là 9 chu trình trong tế bào mà các MRP tham gia vào (bảng 1). Quá trình phiên mã (có 20 *AtMRP*, chiếm 18,01%), biến đổi protein (12 *AtMRP* tương đương

10,81%) và con đường tín hiệu Ca<sup>2+</sup> (tương ứng với 6 *AtMRP*, chiếm 5,4%) là 3 nhóm chức năng chính có sự tham gia của MRP. Bên cạnh đó, một số MRP cũng rải rác trong các chu trình quan trọng khác như liên kết và vận chuyển kim loại, tương tác với yếu tố bất lợi, hình thành RNA, chu kỳ tế bào, liên quan đến sự phát triển của tế bào. Những phân tích này đã phỏng đoán vai trò của các protein giàu Met vào trong tế bào thực vật. Điều này cũng cho thấy, trong trường hợp có yếu tố bất lợi tác động đến tế bào thực vật và ROS được tạo ra, các MRP này dễ dàng bị ôxi hóa, từ đó làm rối loạn những chu trình như đã phân tích, gây tổn thương tế bào.

Để nhận biết đích đến của MRP trong tế bào, chúng tôi đã sử dụng 3 công cụ bao gồm TargetP, pSORT và CELLO để dự đoán dựa trên trình tự polypeptide của 121 MRP [8, 14, 37]. Mục đích của việc dự đoán này nhằm biết rõ hơn vị trí hoạt động của MRP trong các bào

quan, từ đó có thể suy ra vai trò và chức năng của chúng. Có 21 MRP được dự đoán có đích đến ở lục lạp, trong khi chỉ có 9 MRP được dự đoán là cư trú trong ty thể của tế bào thực vật. Để tăng mức độ tin cậy của kết quả, chúng tôi đã kiểm chứng lại vị trí bào quan mà 121 *AtMRP* cư trú bằng phần mềm Blast2GO phiên bản 3.1 [5] và cũng đã đếm được 9 trình tự *AtMRP* trên ty thể. Điều này làm tăng mức độ tin cậy từ kết quả dự đoán về đích đến của MRP trong tế bào. Như đã biết, lục lạp và ty thể là hai bào quan sản sinh ROS [1, 21], chính điều này làm các MRP cư trú trong đó dễ dàng bị ôxi hóa khi lượng ROS tăng cao do yếu tố bất lợi tác động. Như vậy, kết quả dự đoán vị trí cư trú của MRP trong tế bào bước đầu có thể nhận định được vai trò của chúng tham gia trong các bào quan.

#### Mức độ phiên mã của *AtMRP* trong điều kiện thường và điều kiện bất lợi

Trong nghiên cứu này, yếu tố bất lợi được chúng tôi quan tâm là hạn và độ mặn cao. Đây được coi là những yếu tố gây nguy hại nhất cho thực vật, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây trồng

[26, 32]. Dựa trên kết quả phân tích biểu hiện gen bằng microarray công bố trước đây trên cây *Arabidopsis thaliana* xử lý hạn và mặn, chúng tôi đã khai thác được mức độ phiên mã của gen *AtMRP* [23, 24]. Nishiyama et al. (2013) [24] đã nghiên cứu dữ liệu biểu hiện của dòng đột biến AHPs và kiểu đại (Col-0) trong điều kiện hạn và đủ nước (đối chứng). Kết quả phân tích được thu thập từ GEO có mã truy cập là GSE42290. Trong một nghiên cứu khác, dữ liệu biểu hiện của dòng đột biến thiếu cytokinin IPT và chủng đại trong điều kiện xử lý độ mặn cao và đối chứng được đánh giá để tìm hiểu vai trò của cytokinin trong đáp ứng bất lợi về muối [23]. Dữ liệu của nghiên cứu được truy cập theo số hiệu series GSE32087.

Những gen có mức độ phiên mã thay đổi (fold change) ít nhất 2 lần được coi là có đáp ứng trong điều kiện bất lợi. Kết quả chúng tôi thu được 23 và 16 gen *AtMRP* có mức độ phiên mã tăng hoặc giảm tương ứng trong điều kiện hạn, 11 và 17 gen có mức độ phiên mã tăng và giảm tương ứng khi xử lý mặn. Khai thác dữ liệu trong hai điều kiện hạn và mặn, chúng tôi phát hiện được 10 gen *AtMRP* có đáp ứng phiên mã trong cả hai điều kiện hạn và mặn (bảng 2).

Bảng 2. Gen *AtMRP* có mức độ phiên mã đáp ứng với hạn và độ mặn cao

S	Gene ID	Met (%)	Xử lý hạn		Xử lý mặn		Mô tả gen
			Mức độ thay đổi	q-value	Mức độ thay đổi	q-value	
1	AT1G32560	6,02	135,3	0,002	3,3	0,005	Protein chứa vùng LEA nhóm I [4]
2	AT1G33860	8,55	2,4	0,092	2,2	0,003	Chưa biết protein
3	AT3G55240	6,12	-60,2	0,007	-26,9	0,001	Siêu biểu hiện dẫn đến sự “già vàng úa trong ánh sáng” [16]
4	AT3G59900	6,2	10,7	0,011	-2,6	0,015	Chưa rõ chức năng
5	AT3G62090	6,38	64,6	0,020	2,3	0,002	Nhân tố phiên mã [6]
6	AT4G12334	6,25	-9,8	0,003	-3,0	0,005	Gen giả mã hóa họ chuỗi truyền điện tử P450 [20]
7	AT4G33467	8,91	337,5	0,002	6,2	0,023	Chưa rõ chức năng
8	AT4G34590	6,33	8,3	0,004	3,3	0,002	Nhân tố phiên mã [27]
9	AT5G42325	6,03	2,7	0,028	2,4	0,049	Nhân tố phiên mã IIS [29]
10	AT5G67390	7,43	-4,2	0,015	-4,1	0,001	Chưa rõ chức năng

Cụ thể hơn, gen AT4G33467, nằm trên vùng chưa được chú giải trong bộ gen của *Arabidopsis thaliana* [22], có mức độ phiên mã tăng 337,5 lần trong điều kiện hạn và tăng khoảng 6,2 lần trong điều kiện mặn (bảng 2).

Một gen khác như AT1G32560, mã hóa cho protein chứa vùng domain LEA nhóm 1 liên quan đến sự cảm ứng với điều kiện mất nước [4], gen này được tăng cường biểu hiện gấp 135,3 lần trong điều kiện hạn (bảng 2). Ngược

lại, gen bị kim hãm biểu hiện mạnh nhất là AT3G55240, mức độ biểu hiện của gen này giảm tương ứng là 60,3 và 26,9 lần trong điều kiện hạn và mặn (bảng 2). Ichikawa et al. (2006) [16] đã báo cáo về sự siêu biểu hiện của gen này gây ra hiện tượng “giả vàng úa trong điều kiện ánh sáng” (Pseudo-Etiolation in Light, PEL). Bên cạnh đó, gen AT3G62090 được cho là mã hóa cho yếu tố phiên mã bHLH nhận biết yếu tố điều hòa Myc [6], có mức độ biểu hiện được tăng cường gấp 64,6 và 2,3 lần trong khi xử lý hạn và mặn (bảng 2).

Dự đoán vị trí cư trú của các gen ứng viên có thể đưa ra một số giả thuyết cho những nghiên cứu tiếp theo. Gen AT1G32560 mã hóa protein LEA nhóm 1 được dự đoán có đích đến ở ty thể. Với mức độ phiên mã tăng cường gấp 135,3 lần trong điều kiện hạn, protein mã hóa bởi AT1G32560 được sản xuất liên tục sẽ tham gia vào cơ chế chống chịu hạn và bảo vệ bào quan khỏi tác động của hạn. Một vài báo cáo đã chỉ ra rằng, siêu biểu hiện một số gen LEA có thể cải thiện tính chống chịu của cây chuyển gen [25, 35]. Goyal et al. (2005) [3] đã tìm ra protein LEA nhóm 1 từ lúa mì có thể ngăn chặn sự kết dính của một số protein bị mất nước trong tế bào [11]. Gần đây, người ta đã phát hiện ra protein LEA nhóm I ở thực vật cũng tồn tại trong vi khuẩn *Bacillus subtilis* và động vật không xương sống *Artemia franciscana*. Hơn nữa, từ vai trò ngăn chặn sự bất hoạt enzyme của vi khuẩn trong điều kiện xử lý đông có thể gợi ý ra được vai trò tương tự của protein này trên thực vật.

#### Vai trò của việc siêu biểu hiện AT3G55240 trong điều kiện mặn ở cây *Arabidopsis*

Gen AT3G55240 là gen bị kim hãm mạnh nhất trong điều kiện bất lợi. Điều này cho phép đặt ra giả thuyết về vai trò của gen AT3G55240 trong sự miễn cảm của cây *Arabidopsis thaliana* đối với điều kiện bất lợi. Để kiểm chứng giả thuyết này, chúng tôi đánh giá kiểu hình trong điều kiện bất lợi của cây kiểu dại và cây siêu biểu hiện gen này.

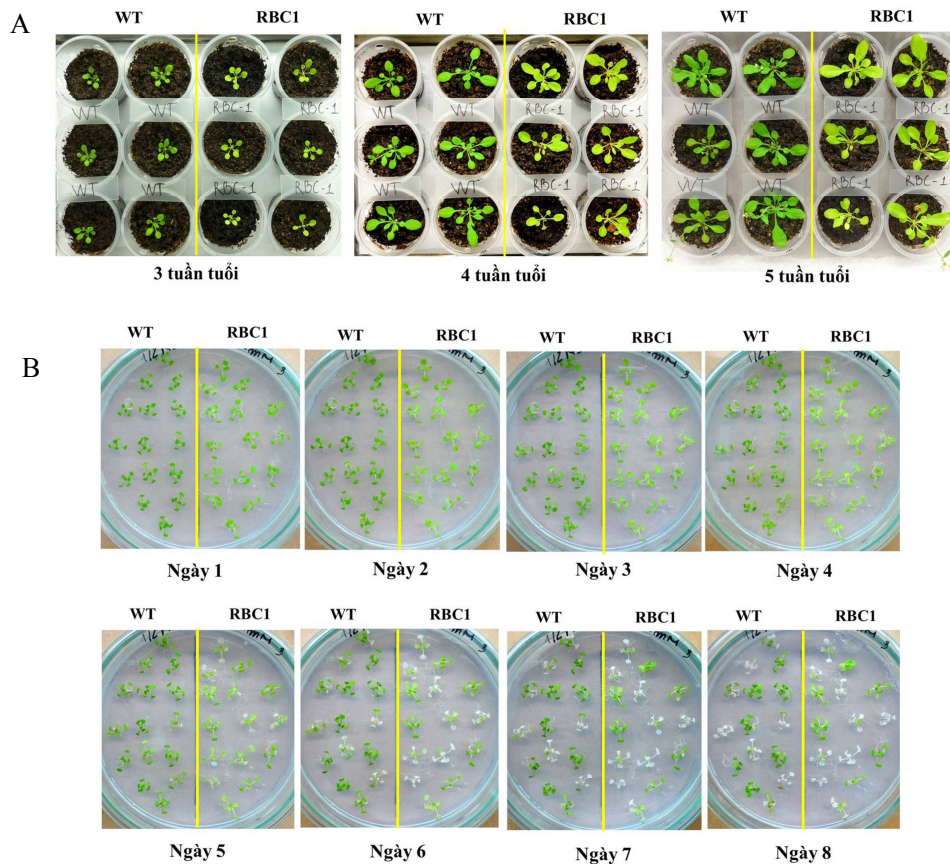
Đầu tiên, hạt cây *Arabidopsis* dòng chuyển gen được lựa chọn và thu thập từ Trung tâm Tài nguyên sinh học RIKEN, đặt tên là RBC1 (RIKEN Bioresource Center 1). Dòng này siêu

biểu hiện gen AT3G55240. Đây là dòng được tạo ra từ chủng *Agrobacterium* GV3101 chứa vector 35S:AT3G55240 biến nạp vào cây mô hình *Arabidopsis thaliana* thông qua biện pháp nhúng hoa. Hạt giống thu thập về được gieo trên môi trường chọn lọc để kiểm tra tỷ lệ đồng hợp tử, sau đó so sánh kiểu hình với đối chứng để xác định mức độ đồng nhất về mặt kiểu hình giữa các hạt chuyển gen. Kết quả cho thấy, hạt chuyển gen RBC1 nảy mầm và phát triển bình thường trên môi trường chọn lọc, không xuất hiện thấy hiện tượng cây chuyển gen bị chết trắng sau khi nảy mầm trên môi trường bổ sung hygromycine. Điều này chứng tỏ tỷ lệ nảy mầm của hạt thí nghiệm đạt trạng thái tốt, hạt chuyển gen đều ở trạng thái đồng hợp tử, đạt đủ yêu cầu để tiến hành phân tích mức độ đáp ứng của cây chuyển gen đối với điều kiện bất lợi. Quan sát kiểu hình hạt chuyển gen RBC1 và đối chứng, chúng tôi nhận thấy lá của RBC1 ở 4-5 tuần tuổi trở đi có màu xanh nhạt hơn rõ rệt so với đối chứng (hình 1a). Kiểu hình này được gọi là hiện tượng “giả vàng úa trong ánh sáng” đã ghi nhận trong nghiên cứu trước đây [16]. Ichikawa et al. (2006) [16] khi xem xét đặc tính của lục lạp của kiểu hình PEL không nhận thấy sự khác biệt lớn so với đối chứng, chứng tỏ kiểu hình PEL không ảnh hưởng đến quá trình quang hợp của dòng RBC1.

Để đánh giá mức độ miễn cảm của dòng chuyển gen AT3G55240 trong điều kiện mặn, chúng tôi xác định tỷ lệ sống sót của cây chuyển gen trên môi trường ½ MS có bổ sung muối NaCl ở nồng độ 175 mM. Quan sát số lượng cây chết trắng lá sau xử lý cho thấy, dòng chuyển gen RBC1 và đối chứng đều có biểu hiện miễn cảm trong điều kiện NaCl nồng độ cao. Sau 5 ngày xử lý, bắt đầu quan sát thấy hiện tượng lá bị chết trắng trên các mẫu cây. Từ ngày thứ 6-8, số lượng cây chuyển gen RBC1 bị chết trắng tăng nhanh, so với đối chứng (hình 1b). Kết quả này cho thấy, việc siêu biểu hiện gen AT3G55240 đã làm tăng tính miễn cảm của cây *Arabidopsis* với điều kiện mặn.

Ở cây chuyển gen, protein mã hóa bởi AT3G55240 liên tục được tổng hợp, và vì thế, các phân tử giàu Met này dễ dàng bị ôxi hóa gây biến tính bởi ROS tích tụ trong tế bào trong điều kiện bất lợi. Việc tồn tại một lượng lớn

protein này nhưng bị mất chức năng trong tế bào có thể là lý do khiến cây chuyển gen mẫn cảm hơn với điều kiện bất lợi so với đối chứng.



Hình 1. Thí nghiệm đánh giá mức độ đáp ứng của dòng RBC1 trong điều kiện mặn

- A. Sự sai khác về hình thái cây chuyển gen RBC1 so với đối chứng;  
 B. Tỷ lệ sống sót của cây non chuyển gen RBC1 trong điều kiện 175 mM NaCl.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được 121 gen mã hóa MRP trên *Arabidopsis thaliana*. Khoảng 50% MRP đã biết chức năng đóng vai trò quan trọng trong tế bào như điều hòa phiên mã và con đường tín hiệu  $Ca^{2+}$ . Trong số 121 MRP, có 21 protein có đích đến là lục lạp, trong khi đó 9 MRP cư trú ở ty thể.

Qua khai thác dữ liệu biểu hiện gen, đã xác định được 23 và 16 gen *AtMRP* tăng hoặc giảm phiên mã ít nhất 2 lần trong điều kiện hạn; 11 và 17 gen *AtMRP* có mức phiên mã tăng hoặc giảm ít nhất 2 lần trong điều kiện mặn; 10 gen *AtMRP* có mức độ phiên mã đáp ứng với cả

điều kiện hạn và mặn. Gen AT4G33467 có mức tăng cường biểu hiện mạnh nhất, gấp 337,5 lần trong điều kiện hạn. Gen bị giảm biểu hiện mạnh nhất trong cả 2 điều kiện là AT3G55240.

Đánh giá kiểu hình của dòng RBC1 siêu biểu hiện gen AT3G55240 cho thấy, cây chuyển gen mẫn cảm hơn so với đối chứng trong điều kiện 175 mM NaCl.

Kết quả này bước đầu cung cấp những dẫn liệu quan trọng cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm phân tích vai trò của gen mã hóa MRP liên quan đến tính chống chịu ở thực vật.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển Khoa

học và Công nghệ Việt Nam (NAFOSTED) mã số 106-NN.02-2013.46.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asada, Kozi, 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2): 391-396.
2. Barrett T., Wilhite S. E., Ledoux P., Evangelista C., Kim I. F., Tomashevsky M., Marshall K. A., Phillippy K. H., Sherman P. M., Holko M., Yefanov A., Lee H., Zhang N., Robertson C. L., Serova N., Davis S., Soboleva A., 2013. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue): D991-995.
3. Campos F., Cuevas-Velazquez C., Fares M. A., Reyes J. L., Covarrubias A. A., 2013. Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaea and bacteria domains. *Molecular Genetics and Genomics*, 288(10): 503-517.
4. Candat A., Paszkiewicz G., Neveu M., Gautier R., Logan D., Avelange-Macherel M. H., Macherel D., 2014. The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in *Arabidopsis* offers tailored protection against abiotic stress. *The Plant Cell*, 26(7): 3148-3166.
5. Conesa A., Götz S., García-Gómez J. M., Terol J., Talón M., Robles M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3676.
6. Ding Y., Liu N., Virilouvet L., Riethoven J. J., Fromm M., Avramova Z., 2013. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13: 229.
7. Edgar R., Domrachev M., Lash A. E., 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 207-210.
8. Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4): 1005-1016.
9. Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J. L., 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2-3): 131-141.
10. Goodstein D. M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R. D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D. S., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue): D1178-1186.
11. Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388(Pt 1): 151-157.
12. Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
13. Hesse H., Kreft O., Maimann S., Zeh M., Hoefgen R., 2004. Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(404): 1799-1808.
14. Horton P., Park K. J., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C. J., Nakai K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue): W585-7.
15. Hoshi T., Stefan H. H., 2001. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology*, 531(Pt 1): 1-11.
16. Ichikawa T., Nakazawa M., Kawashima M., Iizumi H., Kuroda H., Kondou Y., Tshuhara Y., Suzuki K., Ishikawa A., Seki M., Fujita M., Motohashi R., Nagata N., Takagi T., Shinozaki K., Matsui M., 2006. The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *The Plant Journal*, 48(6): 974-985.

17. Kim G., Weiss S. J., Levine R. L., 2014. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochimica Biophysica Acta.*, 1840(2): 901-905.
18. Le Bras M., Clement M. V., Pervaiz S., Brenner C., 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*, 20(1): 205-219.
19. Lieber C. S., Packer L., 2002. S-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects--an introduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5): 1148-1150.
20. Mayer K., Schuller C., Wambutt R., Murphy G., Volckaert G., Pohl T., Dusterhoft A., 1999. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402(6763): 769-777.
21. Moller I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 561-591.
22. Moskal W. A., Wu H. C., Underwood B. A., Wang W., Town C. D., Xiao Y., 2007. Experimental validation of novel genes predicted in the un-annotated regions of the *Arabidopsis* genome. *BMC Genomics*, 8: 18.
23. Nishiyama R., Le D. T., Watanabe Y., Matsui A., Tanaka M., Seki M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Lam-Son T. P., 2012. Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS ONE*, 7(2): e32124.
24. Nishiyama R., Watanabe Y., Leyva-Gonzalez M. A., Chien H. V., Fujita Y., Tanaka M., Seki M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Herrera-Estrella L., Lam-Son T. P., 2013. *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12): 4840-4845.
25. Olvera-Carrillo Y., Campos F., Reyes J. L., Garcarrubio A., Covarrubias A. A., 2010. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(1): 373-390.
26. Parida A. K., Das A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3): 324-349.
27. Roy B., Vaughn J. N., Kim B. H., Zhou F., Gilchrist M. A., Von Arnim A. G., 2010. The h subunit of eIF3 promotes reinitiation competence during translation of mRNAs harboring upstream open reading frames. *RNA*, 16(4): 748-61.
28. Scherz H., Senser F., Walter Souci S., 2000. Germany, landwirtschaft und forsten bundesministerium für Ernährung, and Lebensmittelchemie Deutsche Forschungsanstalt für, Food composition and nutrition tables. Boca Raton, FL: CRC Press/Medpharm.
29. Tabata S., Kaneko T., Nakamura Y., Kotani H., Kato T., Asamizu E., Miyajima N., 2000. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814): 823-826.
30. Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K., 2011. Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 41(6): 649-660.
31. Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L. A., Rhee S. Y., Stitt M., 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37(6): 914-939.
32. Ranna M., 2011. Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities, in *Plant responses to drought and salinity*



- stress-developments in a post-genomic era. Edited by T. Ismail. *Advances in Botanical Research*. Book series, 57: 1-32.
33. Vogt W., 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1): 93-105.
34. Xinwen L., Kaya A., Zhang Y., Le D. T., Hua D., Gladyshev V., 2012. Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. *BMC Biochemistry*, 13(1): 1-10.
35. Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T., Wu R., 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110(1): 249-257.
36. Yang S. F., Adams D. O., Lizada C., Yu Y., Bradford K. J., Cameron A. C., Hoffman N. E., 1980. Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis, in *Plant Growth Substances 1979*, Edited by F. Skoog. Springer Berlin Heidelberg, 219-229.
37. Yu C. S., Chen Y. C., Lu C. H., Hwang J. K., 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, 64(3): 643-651.
38. Yuanqing J., Bo Y., Neil H., Michael D., 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(13): 3591-3607.
39. Zhu J., Ding P., Li Q., Gao Y., Chen F., Xia G., 2015. Molecular characterization and expression profile of methionine sulfoxide reductase in maize (*Zea mays*) under abiotic stresses. *Gene*, 562(2): 159-168.

## ON THE ROLES OF GENES ENCODING METHIONINE-RICH PROTEINS IN *Arabidopsis thaliana* IN RESPONSE TO ABIOTIC STRESSES

Chu Duc Ha<sup>1</sup>, Le Thi Ngoc Quynh<sup>1,2</sup>, Pham Thi Ly Thu<sup>1</sup>,  
Nguyen Quang Huy<sup>2</sup>, Le Tien Dung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Science

<sup>2</sup>Biology Faculty, University of Science - Vietnam National University

### SUMMARY

Methionine (Met) is an essential amino acid, which plays an important role in the plant cells. Oxidation of Met residues in proteins caused by abiotic stresses can lead to damages in cellular components, which may further affect metabolism, signal transduction in the cell and consequently the viability of organisms. In this study, 121 genes encoding Met-rich proteins (MRP) were identified from *Arabidopsis thaliana* database. Gene ontology analysis showed that the cellular functions of half of these genes are yet to be known. Based on their transcript levels under normal and stress conditions, we found that 23 and 16 *AtMRP* genes were induced and repressed more than 2-fold, respectively, under dehydration. On the other hand, 11 and 17 genes were induced and repressed more than 2-fold, respectively, under high salinity treatment. Of these, 10 *AtMRP* genes were transcriptionally responsive to both drought and high salinity. AT4G33467 was the most induced gene, its transcript level was up-regulated 337.5-fold by drought. Among stress-repressed genes, AT3G55240 was the most down-regulated gene, its transcript level was repressed by 60.3 and 26.9-fold under dehydration and high salinity treatments, respectively. The transgenic line RBC1, which overexpressed AT3G55240, was more sensitive to high salinity treatment than the wild type. Taken together, this is the first report on the involvement of genes encoding MRPs in the adaptation of plants to abiotic stresses.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, drought, methionine, methionine rich protein, salinity.

Ngày nhận bài: 18-10-2015