

VAI TRÒ CỦA YẾU TỐ ĐIỀU HÒA *CIS* TRONG ĐÁP ỨNG CỦA THỰC VẬT VỚI CÁC ĐIỀU KIỆN BẤT LỢI

Chu Đức Hà¹, Lê Tiến Dũng^{2*}

¹Phòng Sinh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp

²Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ và Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp,

*research@letiendung.info

TÓM TẮT: Những thành tựu đạt được gần đây trong nghiên cứu sinh học thực vật, đặc biệt là công nghệ gen và phân tích hệ gen, đã gợi mở ra những hướng đi mới để giải quyết vấn đề an ninh lương thực, đáp ứng với kịch bản biến đổi khí hậu. Yếu tố điều hòa *cis* định vị trên vùng điều hòa của promoter, là vị trí nhận biết của yếu tố phiên mã, tham gia điều hòa biểu hiện của gen đáp ứng với các điều kiện bất lợi. Một số yếu tố điều hòa *cis* quan trọng đã được tìm ra như ABRE cảm ứng với ABA, MYBRS và MYCRS đáp ứng hạn, DRE và LTRE cảm ứng với nhiệt độ... Gần đây, rất nhiều nghiên cứu đã được công bố liên quan đến vai trò của yếu tố điều hòa *cis* ở thực vật trong đáp ứng với các điều kiện bất lợi. Bài viết này tóm tắt và thảo luận về một số yếu tố điều hòa *cis* và sự tham gia của chúng vào biểu hiện gen đáp ứng điều kiện bất lợi ở thực vật. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng thảo luận khả năng áp dụng kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen với hệ thống CRISPR/Cas9 để thay đổi đặc điểm các yếu tố *cis*, nhằm tác động vào mức độ biểu hiện của các gen có vai trò đáp ứng với điều kiện bất lợi để tạo ra các giống cây trồng có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi nhưng không mang gen chuyển.

Từ khóa: Biểu hiện gen, cây trồng, chỉnh sửa hệ gen, chống chịu, yếu tố bất lợi, yếu tố điều hòa *cis*.

MỞ ĐẦU

Điều hòa phiên mã là một trong những cơ chế phân tử quan trọng và thiết yếu bậc nhất đối với sinh vật. Nghiên cứu quá trình điều hòa phiên mã tác động đến sự đóng/mở hoạt động của gen được xem là chìa khóa để giải quyết các vấn đề liên quan đến tính chống chịu yếu tố bất lợi ở cây trồng. Trình tự đặc hiệu liên kết của phân tử DNA với các yếu tố phiên mã (*transcription factors*, TFs) đóng vai trò trung tâm trong sự điều hòa hoạt động của bộ gen, từ đó có thể tác động đến các quá trình sinh học quan trọng như sự sinh trưởng, phát triển và phản ứng lại kích thích từ tác nhân môi trường. Trong đó, việc phát hiện ra yếu tố điều hòa *cis* (*cis regulatory element*, CRE) nằm trong trình tự của promoter của gen được coi là một thành công trong việc giải mã toàn bộ cơ chế điều hòa phiên mã của gen. Rất nhiều kết quả thu được gần đây đã khẳng định sự tham gia của CRE trong con đường dẫn truyền tín hiệu điều khiển các quá trình sinh học diễn ra trong tế bào. Nghiên cứu hiện nay liên quan đến CRE và TF đã cung cấp những dẫn liệu khá đầy đủ về chức năng của chúng và sự phát triển của cây trồng

có tính chống chịu với yếu tố bất lợi phi sinh học. Để tìm hiểu chi tiết về vai trò của CRE trong việc đáp ứng với yếu tố bất lợi ở thực vật và ứng dụng trong việc chọn tạo giống cây trồng chống chịu bất lợi, bài viết này tổng hợp và thảo luận về một số yếu tố điều hòa *cis* tham gia vào điều hòa biểu hiện gen đáp ứng điều kiện bất lợi ở thực vật, bao gồm cả nguyên tắc phát hiện CRE. Với thành tựu của kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen, chúng tôi cũng thảo luận khả năng áp dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để thay đổi trình tự các yếu tố *cis* nhằm tác động vào mức độ biểu hiện của gen để tạo ra các giống cây trồng chống chịu với điều kiện bất lợi nhưng không mang gen ngoại lai.

Điều hòa hoạt động gen của thực vật đáp ứng điều kiện môi trường bất lợi

Điều hòa sự biểu hiện gen được đánh giá như trung tâm của hầu hết các quá trình sinh lý, hóa sinh diễn ra trong tế bào ở sinh vật nhân chuẩn. Một cách khái quát, ở sinh vật đa bào, vật chất di truyền là chuỗi xoắn kép DNA được hình thành từ 4 loại nucleotide (tương ứng với 4 base là A, C, G, T) theo nguyên tắc bổ sung,

được liên kết với các phân tử protein trong nhân tế bào, tạo thành nhiễm sắc thể [9, 10, 75].

Thông qua cơ chế phiên mã và dịch mã tại các bào quan khác nhau, trình tự nucleotide của các gen trên nhiễm sắc thể được sao chép thành trình tự ribonucleotide trên phân tử RNA và chuyển thành trình tự polypeptide trên phân tử protein, từ đó biểu hiện thành tính trạng. Khác với sinh vật nhân sơ, quá trình phiên mã của *Eukaryotes* xảy ra trong nhân, trong khi dịch mã được tiến hành trong tế bào chất (ngoài nhân). Hơn nữa, hầu hết các protein chỉ được sử dụng ở những thời điểm đặc biệt như trong một số pha nhất định của chu kỳ tế bào hoặc khi tế bào đáp ứng lại các yếu tố ngoài môi trường, hoặc trong một số tế bào đặc biệt. Điều này chỉ ra rằng hầu hết các gen đều tồn tại ở trạng thái bất hoạt, có nghĩa là tế bào cần một cơ chế để xác định sự hoạt hóa gen [61]. Sự tách biệt về không gian và thời gian giữa quá trình phiên mã và dịch mã cho phép sinh vật có thể điều hòa sự hoạt động của gen theo rất nhiều cách khác nhau, góp phần tạo nên sự đa dạng trong cấu trúc và chức năng của gen [15].

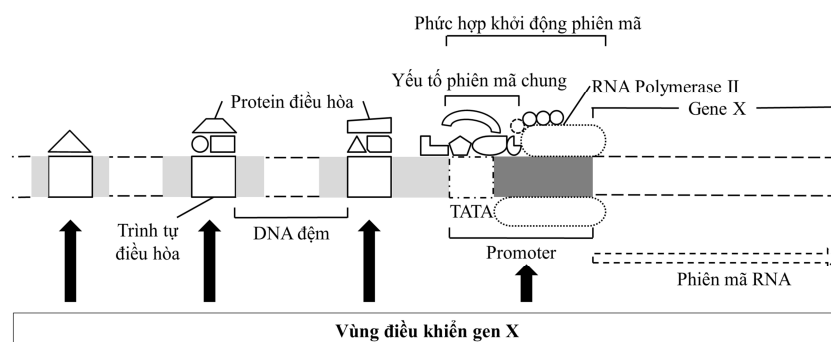
Sự điều hòa hoạt động của gen vì vậy là một trong những cơ chế căn bản nhất cho sinh giới. Các gen ở sinh vật nhân chuẩn, cũng giống như ở sinh vật nhân sơ, đều cần vùng promoter để khởi động quá trình phiên mã [23, 61, 15]. Thông thường, mỗi loại enzyme RNA Polymerase có vùng promoter riêng biệt để tổng hợp phân tử RNA từ mạch khuôn DNA [23]. Trong một số gen, enzyme RNA Polymerase III nhận biết với các vùng promoter để tổng hợp rRNA 5S và các phân tử RNA nhỏ khác. Promoter cho enzyme RNA Polymerase II có thể đơn giản hoặc phức tạp, trong khi RNA Polymerase I trong hạch nhân nhận biết trình tự promoter để phiên mã phức hệ gen rRNA. [55, 15]. Quá trình phiên mã được bắt đầu tại vị trí khởi đầu phiên mã (*Transcription start site*, TSS), là điểm nhận biết của enzyme RNA Polymerase II. Tuy nhiên, cần có sự xuất hiện của yếu tố phiên mã chung (*General Transcription factor*, GTF) để enzyme có thể xác định được vùng trình tự TSS, khi đó phức hợp khởi động phiên mã (*Transcription Initiation Complex*, TIC) được hình thành.

Đã xác định được 2 yếu tố điều hòa liên quan đến hoạt động của TIC bao gồm yếu tố hoạt hóa *trans-* (*trans-acting elements*) và yếu tố hoạt hóa *cis* (*cis acting elements*), trong đó, yếu tố hoạt động *cis* là vùng trình tự nằm dọc theo phân tử DNA mang gen [48, 76, 15]. Một cách nhìn khái quát về cấu trúc gen của sinh vật nhân chuẩn được giới thiệu ở hình 1, thể hiện sự tương tác giữa vùng trình tự CRE, protein điều hòa gen, GTFs. Thuật ngữ CRE được hiểu là vùng trình tự không mã hóa DNA nằm ở vùng thượng nguồn của gen, có chức năng điều hòa quá trình phiên mã của những gen gần đó thông qua việc nhận biết bám cho TFs [76, 77]. Sự biểu hiện gen của sinh vật nhân chuẩn hầu hết được điều khiển bằng quá trình bám dính của TFs với các CRE nằm trong vùng trình tự promoter. Các protein điều hòa có thể bám trên chuỗi DNA thông qua việc nhận biết trình tự CRE đặc hiệu. Quá trình này được giải thích do các tương tác kỵ nước, liên kết hydro và liên kết ion được hình thành giữa của phân tử protein với bề mặt tiếp xúc của vùng trình tự DNA đó [51]. Khi hình thành TIC trên vùng promoter, sự phiên mã gen cấu trúc được quy định theo cấu trúc của protein điều hòa. Chúng có thể gây ra biến đổi dị hình gây ức chế làm enzyme RNA Polymerase không bám được vào TSS, ngăn cản quá trình phiên mã, gọi là làm “đóng” gen trong điều hòa âm tính. Ngược lại, khi TF gắn vào vị trí điều hòa CRE có thể kích thích sự phiên mã, quá trình này gọi là làm “mở” gen trong điều hòa dương tính [68].

Sự thích nghi với yếu tố bất lợi môi trường thông qua sự biểu hiện của những protein liên quan đến tính chống chịu ở thực vật, cho đến nay, vẫn là một bài toán có nhiều lời giải. Thực vật kiểm soát toàn bộ các quá trình sinh trưởng, phát triển và đáp ứng thích nghi môi trường bằng một mạng lưới các con đường điều hòa gen. Cây trồng đã phát triển rất nhiều cơ chế phức tạp để điều hòa sự biểu hiện của gen quy định các protein này. Tác động bất lợi do hạn hán, nồng độ muối cao, và cả nhiệt độ thấp đã gây ra trạng thái mất nước và giảm áp suất thẩm thấu trong tế bào thực vật [52, 59]. Thực vật đáp ứng với trạng thái căng thẳng (stress) bằng cách gia tăng abscisic acid (ABA) trong tế bào. Đây là một hormone rất quan trọng, tham gia vào

quá trình điều hòa các đáp ứng của thực vật với các điều kiện bất lợi môi trường. Một vài nghiên cứu đã chỉ ra rằng, nhìn chung, có 3 cơ chế liên quan đến khả năng đáp ứng của cây trồng với

các yếu tố bất lợi phi sinh học liên quan đến ABA [13, 66, 27, 67]. Đó là chu trình tín hiệu phụ thuộc ABA, không phụ thuộc ABA, và cả hai.



Hình 1. Khái quát về cấu trúc gen của *Eukaryotes* [4]

Vùng promoter với CRE và vị trí gắn hộp TATA. CRE định vị ở thượng nguồn của TSS được nhận biết làm điểm gắn của các TFs để hoạt động như protein điều hòa, từ đó điều khiển sự biểu hiện của gen X.

Thứ nhất, con đường tín hiệu ABA được biết đến như một cơ chế phòng thủ của thực vật nhằm đáp ứng lại môi trường bất lợi [17]. Một vài trình tự bảo thủ quan trọng tham gia vào chu trình tín hiệu ABA đã được tìm thấy [82], chúng được gọi chung là yếu tố đáp ứng ABA (*Abscisic acid responsive element*, ABRE). Vai trò của ABRE là tham gia vào việc đáp ứng của thực vật với yếu tố bất lợi phi sinh học thông qua con đường ABA [35, 36, 82]. Con đường điều hòa hoạt động gen phụ thuộc ABA cũng liên quan tới 2 CRE khác là trình tự nhận biết yếu tố MYB và MYC (*MYB or MYC recognition sequence*, MYBRS/MYCRS). Các yếu tố này được hoạt hóa nhờ liên kết với ABA hoặc các nhân tố phiên mã thuộc họ MYB và MYC cảm ứng hạn như AtMYC2 và AtMYB2 trên *Arabidopsis* [9]. Thứ

hai, liên quan đến chu trình không phụ thuộc ABA, điển hình là nhóm CRE đáp ứng hạn (*Dehydration responsive element*, DRE), được xác định là tham gia vào đáp ứng nhanh với trạng thái mất nước, mặn, nóng và lạnh, ví dụ như *rd29a* [81, 46, 49, 80]. Tương tự như DRE, yếu tố đáp ứng lạnh (*Low temperature responsive element*, LTRE) cũng được phát hiện có trong vùng promoter của một số gen đáp ứng stress không phụ thuộc ABA [5]. Thứ ba, một vài yếu tố điều hòa *cis* khác có liên quan đến cả hai con đường phụ thuộc và không phụ thuộc ABA cũng được phát hiện, chúng tương tác với các TF để đáp ứng với điều kiện bất lợi. Nhóm này cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Đặc điểm của một số yếu tố điều hòa *cis* quan trọng được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Một số yếu tố điều hòa *cis* quan trọng đáp ứng điều kiện bất lợi

| Yếu tố điều hòa <i>cis</i> | Trình tự bảo thủ | Chức năng | Tài liệu tham khảo |
|----------------------------|-------------------------|--|--------------------|
| ABRE | CCACGTGG | Tham gia vào quá trình đáp ứng với ABA | [29, 37, 45, 57] |
| MYBRS | (A/C)ACC(A/T)A(A/C)C | Tham gia vào quá trình đáp ứng hạn | [1, 2, 19, 31] |
| MYCRS | CACATG | Tham gia vào sự đáp ứng sớm với điều kiện hạn và cảm ứng với ABA | [1, 2, 29, 67] |
| DRE | TACCGACAT | Liên quan đến sự đáp ứng với điều kiện mặn, hạn và nhiệt độ thấp | [4, 81] |
| LTRE | ACCGACA; CCGAAA; GTCGAC | Yếu tố đáp ứng nhiệt độ thấp, điều hòa đáp ứng điều kiện lạnh | [14, 29] |

Lịch sử nghiên cứu CRE

Lịch sử nghiên cứu về các CRE được bắt đầu từ khoảng đầu những năm 90 thế kỷ 20, khi các nhà khoa học đánh giá vai trò quan trọng của ABA liên quan đến khả năng chống chịu điều kiện bất lợi ở thực vật [11]. Rất nhiều gen có mức độ phiên mã đáp ứng với các điều kiện bất lợi như hạn, mặn, lạnh... đã được báo cáo, hầu hết các gen này đều được cảm ứng bởi ABA [9, 2, 31, 69]. Trong bài viết này, chúng tôi sẽ trình bày về một số CRE quan trọng tham gia vào sự điều hòa gen đáp ứng với điều kiện bất lợi về nước, nhiệt độ, ánh sáng theo dòng thời gian.

Yếu tố CRE đầu tiên được tìm thấy là ABRE khi Marcotte et al. (1989) tìm ra một đoạn 8 bp có trình tự CACGTGGC trên vùng promoter của gen *Em* ở lúa mì (*Triticum aestivum* L.) cảm ứng với ABA [43, 45, 12]. Một vài công bố đã xác định cấu trúc bZIP nằm trong ABRE nhờ việc tổng hợp cDNAs mã hóa cho protein bám DNA [21, 50]. Sau đó, người ta cũng phát hiện ra cấu trúc ABRE với 8 base bảo thủ là CCACGTGG tham gia vào đáp ứng với ABA và bất lợi về nước trên ngô (*Zea mays* L.) [57], lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) [70], cải dầu (*Brassica napus* L.) [67], lúa (*Oryza sativa* L.) [18, 34]. Ở *Arabidopsis*, người ta đã phát hiện được 2 motif ABRE tham gia vào quá trình điều hòa sự biểu hiện của gen *rd29B*, mã hóa cho protein LEA-like (late embryogenesis abundant, LEA) [72].

ABRE cũng có vai trò trong việc điều hòa sự biểu hiện của gen *DREB2A*, liên quan đến sự mất nước nội bào, chống lại căng thẳng gây ra bởi áp suất thẩm thấu trong tế bào [35]. Trên cây đậu Hà Lan (*Pisum sativum*), một vùng trình tự tương tự ABRE được phát hiện trong promoter điều hòa hoạt động của gen *Trg-31* đáp ứng với tình trạng mất nước [8]. Những năm gần đây, sự phát triển mạnh mẽ của công cụ tin sinh học đã cho phép xác định gen mục tiêu đáp ứng điều kiện bất lợi với yếu tố CRE chịu trách nhiệm điều hòa sự phiên mã của chúng. Zhang et al. (2005) đã xây dựng và phân tích yếu tố ABRE trên *Arabidopsis*, dựa trên trình tự bảo thủ của nó trên lúa và các cây ngũ cốc khác. Các kết quả dự đoán sau đó được

kiểm tra bằng kỹ thuật RT-PCR [83]. Trên hoa hướng dương (*Helianthus annuus* L.), yếu tố ABRE cũng được tìm thấy trong vùng promoter của gen *HAB4* liên quan đến sự đáp ứng với hạn ở vùng rễ [42]. Gần đây, vai trò của ABRE tham gia vào mạng lưới tín hiệu của đường sucrose cũng được báo cáo [26]. Đây là một chu trình phức tạp, được cho là tham gia vào phản ứng của thực vật với điều kiện hạn, mặn.

Chức năng của các CRE khác liên quan đến sự biểu hiện của gen cảm ứng ABA đáp ứng trạng thái hạn trong quá trình chín hạt ở ngô đã được báo cáo trong nghiên cứu của Hattori (1992) [24], ở cây thuốc lá chuyển gen (Hattori, 1991) [37]. Trước đó, nhóm tác giả Guerrero et al. (1990) đã công bố một số gen cảm ứng với trạng thái mất nước nhưng không đáp ứng với ABA [20]. Các công bố của Yamaguchi-Shinozaki sau đó đã xác định được vai trò của CRE trong việc đáp ứng với trạng thái mất nước của một số gen theo con đường độc lập với ABA trên cây mô hình *Arabidopsis* [79, 78, 80]. Đến năm 1994, vai trò của yếu tố DRE được xác định có liên quan đến sự biểu hiện của gen *rd29A* trên *Arabidopsis* [81]. Đây là một gen quan trọng nằm trong vùng 8 kb của genome *Arabidopsis*, mã hóa cho nhóm protein ưa nước [80], được điều hòa bởi yếu tố DRE với trình tự bảo thủ là A/GCCGAC, có liên quan đến đáp ứng lại điều kiện hạn [81]. Một số nghiên cứu đã phân tích vai trò DRE, là vị trí bám của TF là DREB1A/CBF3 và DREB2A tham gia vào quá trình biểu hiện gen đáp ứng với hạn hán ở các loài thực vật bậc cao [6, 62]. Trình tự DRE cũng được phát hiện trong vùng promoter điều hòa một số gen quan trọng ở các loài thực vật khác, như gen *CBF* ở loài *Capsella bursa-pastoris* [73, 74], gen *Ca-DREBLP1* ở loài ớt *Capsicum annuum* L. [25], gen *ZFP245* trên lúa [28] đáp ứng lại điều kiện mặn cảm của môi trường. Năm 1994, khi nghiên cứu gen *rd22*, liên quan đến sự đáp ứng trạng thái mất nước trên cây *Arabidopsis*, nhóm tác giả Iwasaki đã xác định được một vài trình tự điều hòa *cis*, nằm trên đoạn trình tự có kích thước 67 bp trong vùng promoter, là vị trí bám của MYB, MYC và GT-1 [31]. Các yếu tố này tham gia vào quá trình đáp ứng với điều kiện hạn thông qua con đường ABA hoặc độc lập với ABA [13, 40, 3]. Có thể

thấy rằng, hầu hết các gen với trình tự điều hòa *cis* nằm trong vùng promoter cảm ứng với điều kiện hạn hán được nghiên cứu cho đến nay đều liên quan đến con đường ABA, sản phẩm của chúng vừa có vai trò trong tính chống chịu hạn và tham gia vào quá trình điều hòa biểu hiện gen và cơ chế dẫn truyền tín hiệu trong tế bào.

Nguyên lý phát hiện CRE

Thực vật đáp ứng với các yếu tố bất lợi thông qua một loạt thay đổi về mặt sinh lý và hóa sinh. Những thay đổi ở cấp độ phân tử diễn ra trong hoạt động của gen nhằm đáp ứng với yếu tố môi trường cho đến nay vẫn nhận được nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Một vài câu hỏi quan trọng được đặt ra là tế bào thực vật cảm ứng với sự thay đổi bất lợi môi trường như thế nào, cơ chế truyền tải tín hiệu từ môi trường vào trong tế bào và dẫn truyền đến nhân diễn ra như thế nào, hay tác động của những tín hiệu bất lợi đến cơ chế phiên mã gen, và cuối cùng là chức năng của các sản phẩm phiên mã của gen đối với khả năng chống chịu yếu tố bất lợi là gì.

Có thể thấy rằng, nghiên cứu về tín hiệu tế bào là chìa khóa để mở ra cơ hội khám phá hệ thống giao tiếp phức tạp của tế bào thực vật với môi trường. Một khía cạnh của chu trình dẫn truyền tín hiệu trong tế bào là mạng lưới điều hòa phiên mã, đã định hướng cho sự biểu hiện gen ở một số tế bào hay cơ quan cụ thể, nhằm đáp ứng lại các tương tác của môi trường.

Về bản chất, quá trình điều hòa sự biểu hiện của gen ở sinh vật nhân chuẩn được tiến hành thông qua sự hoạt động của TFs với các yếu tố CRE nằm trên gen [11, 58, 15]. Ở thực vật, sự điều hòa phiên mã được nghiên cứu có liên quan đến hơn 1500 TF và mỗi TF điều khiển cho hoạt động của 10 đến hàng ngàn gen mục tiêu [22, 60]. CRE, là vị trí gắn của TFs tạo nên phức hợp điều hòa *cis* (*Cis regulatory modules, CRMs*), điều hòa sự biểu hiện của gen cụ thể một cách đặc hiệu. Chính vì vậy, sự phát hiện và xác định các CRE và chức năng tổ hợp của nó trong CRMs rất cần thiết và quan trọng để làm sáng tỏ cơ chế tế bào nhận và trả lời các kích thích từ môi trường.

Cơ sở của việc phát hiện CRE dựa vào việc chúng được phát hiện nằm ở phía trước, xa vị trí promoter trung tâm, cách TSS khoảng 1 kb trở

lại, và tham gia điều hòa biểu hiện của gen đích. Các trình tự này được liên kết với TF, sau đó sẽ ức chế hoặc tăng cường biểu hiện của gen đích. Người ta sẽ tiến hành thiết kế “fusion gene”, nghĩa là xây dựng gen mang vùng promoter của gen đích được dung hợp với gen chỉ thị (hình 2).

Để phân tích vai trò của CRE liên quan đến sự biểu hiện của gen độc lập ABA, Yamaguchi-Shinozaki et al. (1994) đã tạo ra gen dung hợp giữa promoter *rd29A* và gen chỉ thị β -glucuronidase (GUS), sau đó biến nạp vào *Arabidopsis* hoặc cây thuốc lá [81, 80]. Một thiết kế gen khác mang vùng promoter cảm ứng ethylene có độ dài 213 bp và hộp TATA 67 bp của promoter *PRB-1b*, dung hợp với gen chỉ thị GUS được sử dụng để phát hiện yếu tố GCC và trình tự G-box liên quan đến sự biểu hiện cảm ứng với ethylene của gen *PRB-1b* trên cây thuốc lá [64]. Thiết kế gen dung hợp sau này được sử dụng khá rộng rãi như một bước chuẩn bị quan trọng để bước đầu phát hiện vai trò của CRE trong vùng promoter liên quan đến sự biểu hiện của gen [35]. Sau đó, người ta sử dụng phương pháp đột biến điểm có định hướng (site-directed mutagenesis) như một công cụ nghiên cứu mạnh mẽ để phát hiện vị trí CRE trong vùng trình tự promoter (hình 2).

Việc sử dụng đột biến điểm có định hướng trong phát hiện CRE sau này trở nên phổ biến, có thể kể đến như phát hiện yếu tố GCC và trình tự G-box ở promoter *PRB-1b* [64], ABRE ở promoter *rab28* ở ngô đáp ứng ABA và bất lợi về nước [57], Gap box ở promoter *GabA* cảm ứng với ánh sáng trên *Arabidopsis* [53]. Các thiết kế gen mang đột biến điểm ở vùng promoter được biến nạp vào cây mô hình, sau đó sẽ được xử lý trong điều kiện bất lợi để dự đoán vai trò điều hòa của CRE phụ thuộc hay không phụ thuộc vào ABA. Ví dụ điển hình như kết quả công bố của Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993, 1994) đã dự đoán promoter *rd29A* chứa ít nhất hai CRE độc lập tham gia vào sự biểu hiện gen đáp ứng ABA hoặc độc lập ABA cảm ứng bởi trạng thái thiếu nước, trong khi promoter *rd29B* dường như chứa ít nhất 1 CRE tham gia vào sự biểu hiện gen đáp ứng ABA. Tám thiết kế gen (*rd29A*-GUS) với promoter *rd29A* mất vị trí -861, -694, -417, -323, -268, -111, -74, và -61 đã được sử dụng cho phân tích sự biểu hiện của gen

chỉ thị GUS đáp ứng với trạng thái mất nước [80, 81]. Cuối cùng, sử dụng thử nghiệm GUS và các phương pháp xác định mức độ phiên mã và biểu hiện của gen cho phép xác định vai trò của CRE trong điều hòa gen (hình 2). Chúng có thể gây ức chế (điều hòa âm) hoặc tăng cường (điều hòa dương) mức độ biểu hiện của gen đích. Ngày

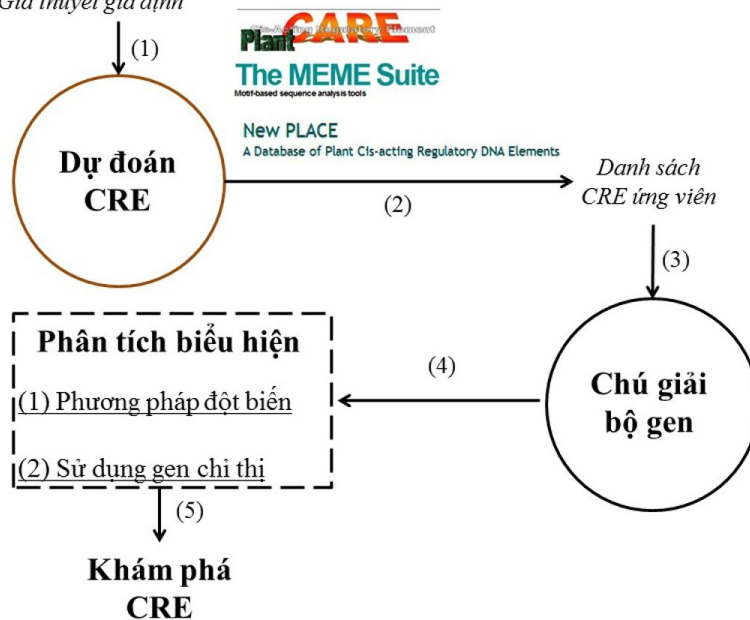
nay, sự phát triển của tin sinh học đã cho phép các nhà khoa học dự đoán được khả năng tồn tại của CRE trong promoter của gen đích với độ tin cậy cao, qua đó có thể tiến hành các phương pháp thực nghiệm như đã miêu tả để kiểm chứng và xác định vai trò của CRE với sự biểu hiện của gen.

Bảng 2. Một số công cụ tin sinh trực tuyến dùng trong phân tích yếu tố điều hòa Cis

| Tên nguồn | Loại | URL | Số lượng trích dẫn* |
|--------------------|------|---|---------------------|
| PLACE | D | http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ | 2013 |
| MEME | P | http://nbc-222.ucsd.edu/meme.html | 1019 |
| PlantCare | D | http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html | 979 |
| TAIR pattern match | P | https://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl | 649 |
| TOUCAN | P, D | https://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000622/lc-b/tools/toucan | 222 |
| AGRIS | D | http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/ | 200 |
| PlantProm | D | http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=plantprom&group=data&subgroup=plantprom | 176 |
| Athena | P, D | http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl | 159 |
| PlantPAN | P, D | http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw | 146 |
| PlantTFDB | D | http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn | 74 |

*Số liệu ghi nhận ngày 2/7/2015 thông qua công cụ GoogleScholar; P. Dự đoán; D. Cơ sở dữ liệu.

Trích dẫn khoa học
 Dẫn chứng thực nghiệm
 Giả thuyết giả định



Hình 2. Các bước để dự đoán và xác định sự có mặt của yếu tố điều hòa cis-trong vùng điều hòa của gen quan tâm

(1; 2; 3): Dự đoán sự xuất hiện của CRE trong vùng promoter của gen đích thông qua việc thu thập dữ liệu và chú giải bộ gen. (4): Sử dụng phương pháp gây đột biến diêm có định hướng và gen chỉ thị để xác định chức năng của vùng trình tự dự đoán là CRE. Từ đó, (5) khám phá ra sự có mặt của CRE trong vùng promoter tham gia vào quá trình điều hòa của gen đích.

Nhờ sự phát triển của thuật toán và công cụ hỗ trợ, đã có một lượng lớn nghiên cứu được công bố liên quan đến vùng trình tự gần TFs và vai trò của chúng trong hệ thống phiên mã của sinh giới (bảng 2). Phương pháp tiếp cận tin sinh học nhằm dự đoán CRE nằm ở vùng thượng nguồn của promoter được tiến hành thông qua việc tìm kiếm các trình tự trung tâm của các CRE quan tâm, đối chiếu với cơ sở dữ liệu trình tự gen của loài được mô tả. Kết quả đưa ra danh sách các CRE tiềm năng với vị trí trên vùng promoter, chức năng liên quan ở các mức ý nghĩa thống kê. Vì vậy, mỗi thuật toán sẽ đưa ra các kết quả với độ tin cậy khác nhau, do đó cần sử dụng một vài thuật toán để so sánh và đối chiếu, qua đó có thể đưa ra giả thuyết tồn tại CRE chính xác nhất.

Về cơ bản, phương pháp của các thuật toán dự đoán và tìm kiếm CRE dựa trên việc cung cấp trình tự promoter (vùng 1000 bp trước TSS) của gen đích, sau đó dựa vào các trình tự bảo thủ của CRE (bảng 1), các thuật toán sẽ dò tìm sự có mặt của các CRE ứng viên trên cơ sở dữ liệu. Ibraheem et al. (2010) đã tiến hành phân tích *in silico* CRE ở vùng điều hòa 5' của họ gen vận chuyển sucrose trên lúa và *Arabidopsis*. Vùng promoter 1,5 kb của gen vận chuyển sucrose lấy từ BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) được sử dụng để dự đoán các CRE liên quan đến bất lợi thông qua Plant CARE, PLACE và biểu diễn trên Genomatix MatInspector professional. Kết quả đã phát hiện ra một vài CRE quan trọng như A-box, RY, CAT, Pyrimidine-box, Sucrose-box, ABRE, ARF, ERE, GARE, Me-JA, ARE, DRE, GA-motif, GATA, GT-1, MYC, MYB, W-box và I-box, điều này cho thấy các CRE có thể có liên quan đến sự biểu hiện và điều hòa của họ gen vận chuyển sucrose ở lúa và *Arabidopsis* trong suốt quá trình phát triển hoặc trong điều kiện bất lợi [4].

Các thuật toán phát hiện và tìm kiếm CRE cũng được sử dụng đồng thời để đánh giá một cách có ý nghĩa sự xuất hiện của CRE trong vùng promoter. Trong một nghiên cứu khác, thông tin về vùng 800 bp promoter của các gen đồng biểu hiện với *LTP5* ở *Arabidopsis* được sử dụng để phát hiện và tìm kiếm CRE liên quan đến bất lợi thông qua Plant CARE [38], kết quả

dự đoán được biểu diễn thông qua SCOPE [7]. Đã xác định được một vài CRE có ý nghĩa trong việc phản ứng với ánh sáng (hộp as-2, hộp AE, trình tự GAG, hộp G), cảm ứng với một số hormone quan trọng (trình tự GARE, hộp P đáp ứng gibberellin, yếu tố TGA đáp ứng auxin). Sự xuất hiện của CRE trong vùng điều hòa có thể được sử dụng để dự đoán sự biểu hiện của gen *LTP5* hoặc các gen đồng biểu hiện [54]. Trong một nghiên cứu khác, người ta đã phân lập và xác định được đặc tính của 30 gene *ZmTIFY* (1 TIFY, 3 ZML, 26 JAZ), chúng rải rác trên 8 nhiễm sắc thể và có liên quan đến đáp ứng điều kiện bất lợi ở ngô. Tiến hành dự đoán và phân tích CRE trên promoter của gen *ZmTIFY* bằng Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) và PLACE. Kết quả cho thấy, sự xuất hiện của một vài CRE trên vùng trình tự 2.000 bp trước TSS có liên quan đến mức độ biểu hiện của gen *ZmTIFY* trong điều kiện hạn. So sánh với dữ liệu GEO, *ZmTIFY4*; 5; 8; 26; 28 được tạo ra trong điều kiện hạn và đạt tới mức độ biểu hiện tối đa khi đáp ứng với điều kiện hạn (53,1% ở Han21; 41,4% ở lá Ye478) [84].

Tiềm năng ứng dụng CRE trong chọn tạo giống cây trồng chống chịu với điều kiện bất lợi

Cho đến nay, vai trò của CRE trong đáp ứng điều kiện bất lợi không chỉ được ứng dụng vào cây lương thực mà còn tạo ra tiềm năng chống chịu cho một số cây trồng quan trọng khác. Ở chi *Citrus*, nhóm nghiên cứu Li đã tìm thấy 19 gen mã hóa cho yếu tố đáp ứng auxin (Auxin response factors, ARF) từ cây cam ngọt (*Citrus genesis*). Tìm kiếm trình tự CRE trong vùng có kích thước 2000 bp của promoter điều hòa gen *CiARF*, đã phát hiện ra 5 nhóm CRE tiềm năng (ARFAT, AUXREPSIAA4, ASF1MOTIFCAMV, GGTCCTCATGMSAUR, và NTBBF1ARROLB) liên quan đến đáp ứng auxin và hoạt hóa quá trình phiên mã. Những nhóm điều hòa này tham gia vào điều hòa biểu hiện của họ gen *CiARF* ở các mô khác nhau (bao gồm rễ, lá, hoa và quả) và trong giai đoạn chín của quả thông qua hoạt động của auxin [40]. Như vậy, việc kết hợp nghiên cứu giữa họ *Citrus* và cây mô hình *Arabidopsis thaliana* cho phép dự đoán mối tương quan giữa chúng, ở đây là dự đoán vai trò

của họ gen *CiARF* cùng với cấu trúc CRE trong vùng promoter điều hòa liên quan đến sự sinh trưởng và phát triển của cây.

Không chỉ những CRE quan trọng (bảng 1) mà các nhóm yếu tố điều hòa *cis* khác đáp ứng điều kiện bất lợi cũng được quan tâm để tăng cường tính chống chịu ở cây trồng. Một loạt các nhóm CRE liên quan đến điều hòa biểu hiện gen được phân tích trên cơ sở dữ liệu của *Arabidopsis* như nhóm yếu tố liên quan đến đáp ứng với ánh sáng (trình tự ATCT, hộp as-2-, hộp AE, hộp I, trình tự GAG, hộp G, hộp I, trình tự TCT, yếu tố LAMP, trình tự GA, trình tự GTGGC), tham gia vào điều khiển đồng hồ sinh học (circadian clock), cảm ứng với chất điều hòa sinh trưởng (trình tự GARE, hộp P-cảm ứng gibberellin, yếu tố TCA-đáp ứng acid salicylic, yếu tố TGA - cảm ứng auxin). Liên quan đến cảm ứng MeJA, một chất sinh ra trong quá trình phòng thủ của cây trồng khi bị côn trùng tấn công, trình tự -CGTCA, -TGACG, -WUN cũng thu hút được sự quan tâm trong nghiên cứu này [54].

Hiện nay, kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen (genome editing) với hệ thống CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), đang trở thành một công cụ phân tích hệ gen hiệu quả cho rất nhiều loài sinh vật [16, 56]. CRISPR, gọi là các đoạn lặp ngắn xuôi ngược cách nhau đều đặn, được biết đến như một hệ thống đáp ứng miễn dịch tự nhiên của *E. coli* [30]. Bản chất của kỹ thuật chỉnh sửa bộ gen bằng hệ thống CRISPR/Cas 9 dựa trên việc cắt chuỗi DNA ở vị trí mong muốn bằng nuclease được định hướng nhờ các phân tử RNA dẫn (guide RNA, gRNA). Kỹ thuật này đang được áp dụng rộng rãi trên nhiều đối tượng như cây mô hình *Arabidopsis* [32, 33, 39], thuốc lá [33, 39], và một số cây trồng quan trọng như ở lúa gạo [33, 65], lúa mì [65], đậu tương [71], ngô [41], cao lương [33]. Vận dụng khả năng cắt có định hướng của Cas9 cho phép hệ thống CRISPR/Cas9 có thể tạo ra các đột biến định hướng ở vùng trình tự promoter, từ đó làm thay đổi mức độ biểu hiện gen.

Các nghiên cứu về chức năng điều hòa của yếu tố CRE thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 đã được công bố trên động vật mô hình như ở

chuột [63], giun *Caenorhabditis* [44], ếch *Xenopus tropicalis* [47]. Đây có thể coi là một hướng nghiên cứu hoàn toàn khả thi trong phân tích vai trò của yếu tố CRE trên cây nông nghiệp đáp ứng điều kiện bất lợi.

Tóm lại, việc cải tiến và phát triển các giống cây trồng có tính chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi là yêu cầu cấp thiết cho ngành nông nghiệp, nhằm đảm bảo an ninh lương thực trong nước cũng như trên thế giới.

Như đã phân tích, sự biểu hiện của gen được tăng cường hay kìm hãm phụ thuộc vào sự tương tác của yếu tố điều hòa *cis*- với yếu tố phiên mã ở vùng promoter. Cho đến nay, 4 phương pháp được ghi nhận để cải tiến và chọn tạo giống mới bao gồm (i) chuyển gen (tạo ra cây trồng biến đổi gen), (ii) lai giống truyền thống (cần nhiều thời gian, tiền của và công sức), (iii) lai truyền thống kết hợp chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử (Marker-assisted selection, MAS), và (iv) chỉnh sửa hệ gen (đòi hỏi kỹ thuật hiện đại, tốn kém).

Trong thực tế nghiên cứu khoa học và sản xuất nông nghiệp như ở Việt Nam hiện nay, kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen còn là vấn đề mới cần được đầu tư lớn về nguồn nhân lực. Tuy nhiên, với sự phát triển mạnh của việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa genome trong nghiên cứu động thực vật trên thế giới hiện nay, việc kết hợp công cụ này với những hiểu biết về điều hòa biểu hiện gen thông qua yếu tố *cis* sẽ là cơ sở để tạo ra các giống mới có khả năng chống chịu với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15(1): 63-78.
2. Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K., 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9(10): 1859-1868.

3. Agarwal P. K., Jha B., 2010, Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54(2): 201-212.
4. Alberts B., 2008. DNA and Chromosomes, in *Molecular biology of the cell*, 5th edition. New York: Garland Science, 191-234.
5. Baker S. S., Wilhelm K. S., Thomashow M. F., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, 24(5): 701-713.
6. Cao Z. F., Li J., Chen F., Li Y. Q., Zhou H. M., Liu Q., 2001. Effect of two conserved amino acid residues on DREB1A function. *Biochemistry*, 66(6): 623-627.
7. Chakravarty A., Carlson J., Khetani R., Gross R., 2007. A novel ensemble learning method for de novo computational identification of DNA binding sites. *BMC Bioinformatics*, 8(1): 1-15.
8. Chaudhary S., Crossland L., 1996. Identification of tissue-specific, dehydration-responsive elements in the *Trg-31* promoter. *Plant Molecular Biology*, 30(6): 1247-1257.
9. Dahm R., 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2): 274-288.
10. Dahm R., 2008. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, 122(6): 565-581.
11. Davies P. J., 1987. Abscisic acid biosynthesis and metabolism, in *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht; Boston; Hingham, MA, USA: M. Nijhoff; Kluwer Academic Publishers, 113-131.
12. Davies W. J., Jones H. G., 1991. Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress, in *Abscisic acid: Physiology and biochemistry*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 67-74.
13. del Carmen Rodríguez-Gacio M., Matilla Vázquez M. A., Matilla A. J., 2009. Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11): 1035-1048.
14. Dunn M. A., White A. J., Vural S., Hughes M. A., 1998. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant Molecular Biology*, 38(4): 551-564.
15. Ferrier D. R., 2014. DNA, RNA, and the flow of genetic information, in *Biochemistry* 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 194-235.
16. Frokjaer-Jensen C., 2013. Exciting prospects for precise engineering of *Caenorhabditis elegans* genomes with CRISPR/Cas9. *Genetics*, 195(3): 635-642.
17. Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4): 509-525.
18. Gomez-Porras J. L., Riano-Pachon D. M., Dreyer I., Mayer J. E., Mueller-Roeber B., 2007. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics*, 8: 260.
19. Gubler F., Kalla R., Roberts J. K., Jacobsen J. V., 1995. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell*, 7(11): 1879-1891.
20. Guerrero F., Jones J., Mullet J., 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology*, 15(1): 11-26.
21. Guiltinan M. J., Marcotte W.R., Quatrano R.S., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250(4978): 267-271.

22. Guo A. Y., Chen X., Gao G., Zhang H., Zhu Q. H., Liu X. C., Zhong Y. F., Gu X., He K., Luo J., 2008. PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*. 36 (Database issue): D966-969.
23. Harvey Lodish A. B., Lawrence Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., 2000. Molecular structure of genes and chromosomes, in *Molecular Cell Biology* 4th edition. New York: W. H. Freeman, 405-445.
24. Hattori T., Vasil V., Rosenkrans L., Hannah L. C., McCarty D. R., Vasil I. K., 1992. The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes and Developments*, 6(4): 609-618.
25. Hong J. P., Kim W. T., 2005. Isolation and functional characterization of the *Ca-DREBLP1* gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Planta*, 220(6): 875-888.
26. Hoth S., Niedermeier M., Feuerstein A., Hornig J., Sauer N., 2010. An ABA-responsive element in the *AtSUC1* promoter is involved in the regulation of *AtSUC1* expression. *Planta*, 232(4): 911-923.
27. Hu X., Zhang A., Zhang J., Jiang M., 2006. Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. *Plant Cell Physiology*, 47(11): 1484-1495.
28. Huang J., Wang J. F., Wang Q. H., Zhang H. S., 2005. Identification of a rice zinc finger protein whose expression is transiently induced by drought, cold but not by salinity and abscisic acid. *DNA Sequence*, 16(2): 130-136.
29. Ibraheem O., Botha C.E.J., Bradley G., 2010. *In silico* analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa Japonica*) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry*, 34(5-6): 268-283.
30. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12): 5429-5433.
31. Iwasaki T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1995. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 247(4): 391-398.
32. Jiang W., Yang B., Weeks D.P., 2014. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS One*, 9(6): e99225.
33. Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P., 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20): e188.
34. Joshee N., Kisaka H., Kitagawa Y., 1998. Isolation and characterization of a water stress-specific genomic gene, *pwsi 18*, from rice. *Plant Cell Physiology*, 39(1): 64-72.
35. Kim J. S., Mizoi J., Yoshida T., Fujita Y., Nakajima J., Otori T., Todaka D., Nakashima K., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2011. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 52(12): 2136-2146.
36. Kim S., Kang J. Y., Cho D. I., Park J. H., Kim S. Y., 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant Journal*, 40(1): 75-87.
37. Lam E., Chua N. H., 1991. Tetramer of a 21-base pair synthetic element confers seed

- expression and transcriptional enhancement in response to water stress and abscisic acid. *Journal Biological Chemistry*, 266(26): 17131-17135.
38. Lescot M., Patrice D., Gert T., Kathleen M., Yves M., Pierre R., Stephane R., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 325-327.
 39. Li J. F., Zhang D., Sheen J., 2014. Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco. *Methods in Enzymology*, 546: 459-472.
 40. Li S. B., OuYang W. Z., Hou X. J., Xie L. L., Hu C. G, Zhang J. Z., 2015. Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Front Plant Sciences*, 6: 119.
 41. Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C., 2014. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal Genetics Genomics*, 41(2): 63-68.
 42. Manavella P. A., Dezar C. A., Ariel F. D., Chan R. L., 2008. Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower *HAHB4* promoter. *Plant Physiology Biochemistry*, 46(10): 860-867.
 43. Marcotte W. R., Russell S. H., Quatrano R. S., 1989. Abscisic acid-responsive sequences from the *em* gene of wheat. *Plant Cell*, 1(10): 969-976.
 44. Michalis Barkoulas A. R., Marie-Anne Félix, 2014. Using the CRISPR/Cas9 system to target cis-regulatory sequences in *C. elegans*. *The Worm Breeder's Gazette*, 20(1): 14-15.
 45. Mundy J., Yamaguchi-Shinozaki K., Chua N.H., 1990. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87(4): 1406-1410.
 46. Nakashima K., Ito Y., Yamaguchi-Shinozaki K., 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology*, 149(1): 88-95.
 47. Nakayama T., Fish M. B., Fisher M., Oomen-Hajagos J., Thomsen G. H., Grainger R. M., 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, 51(12): 835-843.
 48. Narlikar L., Ovcharenko I., 2009. Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 8(4): 215-230.
 49. Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z. K., Furihata T., Sakuma Y., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal*, 34(2): 137-148.
 50. Oeda K., Salinas J., Chua N. H., 1991. A tobacco bZip transcription activator (*TAF-I*) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes. *EMBO Journal*, 10(7): 1793-1802.
 51. Pabo C. O., Sauer R. T., 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review Biochemistry*, 61: 1053-1095.
 52. Parida A. K., Das A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3): 324-349.
 53. Park S. C., Kwon H. B., Shih M. C., 1996. Cis-acting elements essential for light regulation of the nuclear gene encoding the A subunit of chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 112(4): 1563-1571.
 54. Parviz H., Mostafa A., Hamid N. Z., 2015. In silico analysis of cis-regulatory elements on co-expressed genes. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 9(25): 9.

55. Paule M. R., White R. J., 2000. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research*, 28(6): 1283-1298.
56. Pennisi E., 2013. The CRISPR craze. *Science*, 341(6148): 833-836.
57. Pla M., Vilardell J., Gultinan M. J., Marcotte W. R., Niogret M. F., Quatrano R. S., Pages M., 1993. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Molecular Biology*, 21(2): 259-266.
58. Priest H. D., Filichkin S. A., Mockler T. C., 2009. Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5): 643-649.
59. 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 2011*, T. Ismail, Editor. *Advances in Botanical Research*, 57: 1-32.
60. Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pinada O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B. K., Yu G., 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499): 2105-2110.
61. Robert S., 1993. DNA synthesis, in *Genetics and Molecular Biology 2nd edition*. The Johns Hopkins University Press, 53-84.
62. Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J. G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3): 998-1009.
63. Seruggia D., Fernandez A., Cantero M., Pelczar P., Montoliu L., 2015. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 43(10): 4855-4867.
64. Sessa G., Meller Y., Fluhr R., 1995. A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the *PRB-1b* gene. *Plant Molecular Biology*, 28(1): 145-153.
65. Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C., 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 9(10): 2395-2410.
66. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115(2): 327-334.
67. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3): 217-223.
68. Snustad D. P., Simmons M. J., 2003. Transcription and RNA processing, in *Principles of genetics 3rd edition*. New York, NY: John Wiley & Sons, 256-284.
69. Stalberg K., Ellerstrom N., Ezcurra I., Ablov S., Rask L., 1996. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta*, 199(4): 515-519.
70. Straub P. F., Shen Q., Ho T. D., 1994. Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, *HVA1*. *Plant Molecular Biology*, 26(2): 617-630.
71. Sun X., Hu Z., Chen R., Jiang Q., Song G., Zhang H., Xi Y., 2015. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 5: e10342.
72. Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings National Academy of Sciences*

- USA, 97(21): 11632-11637.
73. Wang X., Liu L., Liu S., Sun X., Deng Z., Pi Y., Sun X., Tang K., 2004. Isolation and molecular characterization of a new CRT binding factor gene from *Capsella bursa-pastoris*. *Journal of Biochemical Molecular Biology*, 37(5): 538-545.
74. Wang X., Liu S., Liu X., Chen Z., Liu X., Pang Y., Sun X., Tang K., 2004. Molecular cloning and characterization of a CBF gene from *Capsella bursa-pastoris*. *DNA Sequence*, 15(3): 180-187.
75. Watson J. D., Crick F. H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356): 737-738.
76. Wittkopp P. J., Kalay G., 2012. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics*, 13(1): 9-69.
77. Wray, G.A., 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8(3): 206-216.
78. Yamaguchi Shinozaki K., Koizumi M., Urao S., Shinozaki K., 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation to *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3): 7.
79. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1993. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiology*, 101(3): 1119-1120.
80. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Molecular Genomics and Genetics*, 236(2-3): 331-340.
81. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6(2): 251-264.
82. Yoshida T., Fujita Y., Sayama H., Kidokora S., Maruyama K., Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant Journal*, 61(4): 672-685.
83. Zheng J., Fu J., Gou M., Huai J., Liu Y., Jian M., Huang Q., Guo X., Dong Z., Wang H., Wang G., 2010. Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology*, 72(4-5): 407-421.
84. Zingaretti S.M., Marielle C. I., Livia M. P., Tiago A. P., Suzelei C. F., 2013. Water stress and agriculture. In: *Responses of Organisms to Water Stress*, Edited by Sener A. Intech Open, 151-179.

THE ROLE OF *CIS*- REGULATORY ELEMENTS IN ABIOTIC-STRESS RESPONSES IN PLANTS

Chu Duc Ha¹, Le Tien Dung²

¹Molecular Biology Department, Agricultural Genetics Institute

²National Key Laboratory of Plant and Cell Technology, Agricultural Genetics Institute

SUMMARY

Recent advances in plant biology research, particularly in genetic engineering, had provided new tools to mitigate food security caused by climate changes and rapid population growth. *Cis*-regulatory elements, usually located in the upstream of the promoter region, are the binding sites for transcription factors, and thus, control the expression of the gene. There are several important *cis*-regulatory elements, such as ABRE-involved in the abscisic acid responsiveness; MYBRS and MYCRS - drought responsive elements; DRE and LTRE - temperature responsive elements. Previous studies have shown the importance of *cis*-regulatory elements in stress-adaptation in plants. In this review, we summarized and discussed the roles of *cis*-regulatory elements in the adaptation of plants to abiotic stress and its application potential in development of stress-tolerant plants. Throughout the review, we showed that *cis*-elements could be parts of potential approaches for genetic engineering toward improved crop varieties. Furthermore, we also discussed the possibility to apply genome editing as a tool, such as CRISPR/Cas9 system, to redesign the *cis*-elements in the promoters of stress-responsive genes to generate “*edited crops*” with enhanced stress tolerance through modulating gene expression.

Keywords: *cis*-regulatory element, genome editing, transcription factor, stress tolerance.

Ngày nhận bài: 23-6-2015