

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC XỬ LÝ STRESS THIẾU NƯỚC LÊN HÌNH THÁI LÁ VÀ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN MÃ HÓA DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE (DHDPS) Ở CÂY *MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM*

Hoàng Thị Kim Hồng^{1, ✉}, Phạm Thị Hồng Trang¹, Trương Thị Bích Phượng¹, Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Ngô Thị Minh Thu¹, Nguyễn Thị Quỳnh Trang²

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Huế

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hkhong@hueuni.edu.vn

Ngày gửi bài: 14.6.2016

Ngày nhận đăng: 20.02.2017

TÓM TẮT

Quá trình sinh tổng hợp lysine ở thực vật đã được nghiên cứu rất nhiều nhằm cải thiện chất lượng dinh dưỡng để cung cấp nguồn lysine cần thiết cho đời sống của con người. Trong đó, dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) là một trong những enzyme quan trọng quyết định sự tích tụ lysine trong cây. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của việc xử lý stress thiếu nước lên hình thái và sự biểu hiện của gen mã hóa cho dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) trong lá cây *Mesembryanthemum crystallinum* bước đầu được nghiên cứu đánh giá. Trong các cây *M. crystallinum* trưởng thành, thường quan sát thấy có nhiều tế bào bàng quan (Bladder cell) bao bọc và phủ một lớp óng ánh như những giọt sương phía bên ngoài lá và trên cành cây và khi loại bỏ tất cả các tế bào bàng quan bên ngoài của các lá trưởng thành sẽ quan sát được rất nhiều tế bào khí khổng ở cả mặt trên và mặt dưới lá dưới kính hiển vi phân cực (Nikon, Eclipse 55i POL, vật kính 40). Khi các cây *M. crystallinum* trưởng thành bị xử lý stress thiếu nước từ 5 ngày hoặc 10 ngày, thì hình thái lá và các tế bào khí khổng có sự biến đổi rõ rệt so với mẫu cây được tưới nước bình thường. Kết quả phân tích định lượng mRNA (qRT-PCR) cho thấy việc xử lý stress thiếu nước đã làm thay đổi mức độ biểu hiện của gen DHDPS. Nếu xử lý stress thiếu nước trong thời gian dài (10 ngày) sẽ làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của gen DHDPS trong lá cây *M. crystallinum*. Ngoài ra, các mẫu lá của cây *M. crystallinum* có chứa một lượng đáng kể enzyme DHDPS, đồng thời hoạt động của enzyme này có sự biến đổi khác nhau trong các điều kiện xử lý stress thiếu nước của môi trường.

Từ khóa: Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), gen mã hóa DHDPS, khí khổng, *M. crystallinum*, tế bào bàng quan (bladder cell), xử lý stress thiếu nước

MỞ ĐẦU

Mesembryanthemum crystallinum là một trong số các loài thực vật CAM (Crassulacean acid metabolism) có nguồn gốc từ vùng khô hạn ở châu Phi, có bộ gen khoảng 390 Mb chứa trong 9 cặp nhiễm sắc thể ($2n = 18$). Điểm đặc trưng nổi bật của *M. crystallinum* là có khả năng chuyển hóa cơ chế cố định CO_2 trong quang hợp từ chu trình CAM sang chu trình C3 và ngược lại. Bên cạnh đó, *M. crystallinum* vừa có khả năng chịu hạn tốt, vừa có khả năng chịu mặn cao nên nhanh chóng trở thành đối tượng mô hình được nhiều chuyên gia về thực vật CAM đặc biệt quan tâm nghiên cứu (Bohnert, Cushman, 2000).

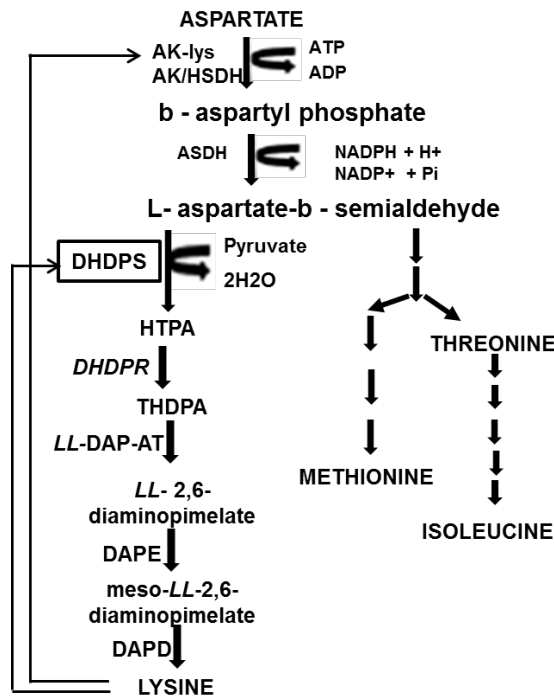
M. crystallinum không những có giá trị lớn về mặt khoa học mà còn có ý nghĩa về mặt thực tiễn, đặc biệt là trong những năm gần đây, loại cây này đã trở thành một loại rau thương hiệu, có giá trị dinh dưỡng lớn. *M. crystallinum* là đối tượng cây trồng mới không nằm trong danh mục cơ cấu giống cây trồng của Việt Nam, vì thế việc du nhập và phát triển chúng trên một số địa bàn ở nước ta đồng thời sử dụng chúng làm nguồn vật liệu để nghiên cứu, làm cơ sở khoa học cho việc khai thác và sử dụng nguồn thực vật CAM có khả năng thích nghi tốt với sự biến đổi khí hậu toàn cầu hiện nay là một việc làm cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn rõ rệt. Ngoài ra, lá của *M. crystallinum* có vị chua nhẹ và hơi mặn. Thân cây có chứa một lượng lớn các thành phần chức năng khác nhau như Inositol - chất rất cần thiết

để thúc đẩy tăng trưởng của tế bào, β -carotene - có hiệu quả trong việc phòng chống ung thư, vitamin K - chất béo hòa tan, rất cần thiết cho việc đông máu và ngăn ngừa lắng đọng canxi trong xương, proline - chất hữu ích cho việc tăng cường hoạt động giữ ẩm của lớp da sừng, cải thiện tình trạng da và thúc đẩy đổi mới làn da bình thường. Do vậy, *M. crystallinum* còn được chế biến thành các sản phẩm làm đẹp (Bohnert, Cushman, 2000; Patricia *et al.*, 1998).

Hiện nay, *M. crystallinum* được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về khả năng chống chịu, nhất là chịu hạn và chịu mặn, nhưng trong thực tế quá trình trao đổi amino acid cũng như sinh tổng hợp lysine trong cây *M. crystallinum* là một vấn đề hoàn toàn mới chưa được quan tâm. Gần đây, các công trình nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cơ chế chuyển hóa malic acid bên trong ty thể của một số loài thực vật CAM có thể cung cấp năng lượng ATP và cơ chất cho các quá trình sinh tổng hợp và chuyển hóa amino acid xảy ra bên ngoài ty thể. Điều đáng lưu ý là khi nghiên cứu ở ty thể của *Hosa carnososa*, một

loài thực vật CAM trung gian tương tự *M. crystallinum*, chúng tôi khám phá ty thể của *H. carnososa* có khả năng chuyển hóa malate theo cơ chế vận chuyển hai chiều thông qua protein tải malate và aspartate (malate-aspartate shuttle) (Hong *et al.*, 2008), do vậy lượng aspartate tạo thành trong chất nền của ty thể có thể được chuyển ra bên ngoài và trở thành một nguồn cơ chất có sẵn tham gia vào quá trình sinh tổng hợp và chuyển hóa lysine.

Trong thực tế, lysine là một amino acid thiết yếu quan trọng nhất, cần có trong khẩu phần ăn của con người và động vật, tuy nhiên bản thân người và động vật không tự tổng hợp được lysine mà phải lấy từ nguồn thức ăn bên ngoài do thực vật cung cấp. Quá trình chuyển hóa lysine ở thực vật C3 và C4 đã được nghiên cứu rất nhiều với mục đích nhằm cải thiện chất lượng dinh dưỡng để cung cấp nguồn lysine cần thiết cho đời sống của con người. Ở thực vật, quá trình tổng hợp lysine được điều hòa chủ yếu bởi cơ chế ức chế ngược của lysine đối với DHDPS như đã thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Con đường chuyển hóa Aspartate để hình thành lysine ở trong cây (Ellen *et al.*, 2013). AK: aspartate kinase, HSDH: homoserine dehydrogenase, ASDH: aspartate semialdehyde dehydrogenase, HTPA: hydroxytetrahydrodipicolinic acid, DHDPR: dihydrodipicolinate reductase, THDPA: tetrahydrodipicolinate, LL-DAP-AT: LL-diaminopimelate aminotransferase, DAPE diaminopimelate epimerase, DAPD: meso diaminopimelate decarboxylase.

Nhiều loài thực vật có khả năng tổng hợp lysine, nhưng nếu lượng lysine tổng hợp và tích lũy quá nhiều trong cơ thể sẽ gây độc và ảnh hưởng đến sự sống của thực vật (Galili, 1995). Khả năng ức chế ngược của lysine đối với hoạt động của DHDPS là một trong những cơ chế quan trọng giúp thực vật điều hòa và cân bằng lượng lysine trong cơ thể (Ellen *et al.*, 2013). Bài báo này trình bày các kết quả đạt được khi gieo trồng *M. crystallinum* và thăm dò ảnh hưởng của việc xử lý stress thiếu nước lên hoạt độ của enzyme DHDPS trong cây *M. crystallinum*. Đồng thời, kỹ thuật qRT-PCR được sử dụng để xác định nhanh sự biểu hiện của gen DHDPS trong các mẫu lá cây *M. crystallinum* dưới điều kiện thường và trong điều kiện bất lợi của môi trường khi cây không được tưới nước.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là cây *M. crystallinum* trồng từ hạt, nguồn hạt giống do Giáo sư John Cushman ở Trường Đại học Nevada (Mỹ) cung cấp. Các cây *M. crystallinum* trưởng thành được chọn lọc và cho vào 3 lô khác nhau trong đó lô 1 làm lô đối chứng, cây được chăm sóc và tưới nước bình thường, lô 2 và lô 3 chứa các cây thí nghiệm được trồng và chăm sóc như các cây ở lô đối chứng tuy nhiên xử lý stress thiếu nước bằng cách không tưới nước và thu mẫu sau 5 ngày (lô 2) và 10 ngày (lô 3).

Mẫu lá tách từ các cây *M. crystallinum* trưởng thành ở cả ba lô được thu trong cùng thời điểm (9 giờ sáng) và cô định mẫu trong nitrogen để tách chiết và xác định hoạt độ của enzyme DHDPS, và đánh giá biểu hiện của gene DHDPS ở cả ba lô thí nghiệm bằng kỹ thuật qRT-PCR, sử dụng máy CFX96 Touch real-time PCR.

Ngoài ra, một lượng mẫu lá ở cây *M. crystallinum* ở lô 1, 2 và 3 còn được sử dụng để nghiên cứu sự biến đổi hình thái lá dưới tác dụng stress nước của môi trường. Sử dụng kính hiển vi điện tử phân cực (Nikon, Ecligse 55i) với vật kính 40 để quan sát hình thái khí khổng của các mẫu lá của các cây đối chứng và cây thí nghiệm.

Tách chiết RNA từ lá và xác định hàm lượng, chất lượng của RNA

Mẫu lá cây *M. crystallinum* (30 mg) được nghiền mịn trong nitrogen lỏng, sau đó hòa tan mẫu trong 175 μ l đệm tách RNA (RNA lysis buffer), bổ

sung thêm 350 μ l, đệm hòa tan RNA (RNA Dilution Buffer), lắc đều và ủ ở 70°C trong 3 phút, sau đó ly tâm mẫu ở 12.000 vòng trong 10 phút ở 25°C, sau ly tâm, loại bỏ phần cặn và thu lấy dịch nổi bên trên rồi bổ sung thêm 200 μ l ethanol 95%, trộn đều và chuyển toàn bộ hỗn hợp sang cột lọc (Spin Column) và ly tâm ở 12.000 vòng trong 1 phút, loại bỏ phần dịch bên dưới cột lọc, tiếp tục bổ sung 600 μ l dịch rửa RNA vào cột lọc và tiếp tục ly tâm ở 12.000 vòng trong 1 phút sau đó loại bỏ phần dịch bên dưới cột lọc. Tiếp tục bổ sung 50 μ l hỗn hợp gồm 40 μ l đệm Yellow core, 5 μ l 0,09 M MnCl₂ và 5 μ l DNase I enzyme và ủ mẫu trong 15 phút ở 25°C. Tiếp tục bổ sung thêm 200 μ l dịch ngừng phản ứng enzyme (DNase stop solution) rồi ly tâm mẫu ở 12.000 vòng trong 1 phút, sau ly tâm, loại bỏ phần dịch bên dưới cột lọc, tiếp tục bổ sung 600 μ l dịch rửa RNA vào cột lọc và tiếp tục ly tâm ở 12.000 vòng trong 1 phút, sau đó loại bỏ phần dịch bên dưới cột lọc. Tiếp tục bổ sung 250 μ l dịch rửa RNA vào cột lọc và tiếp tục ly tâm ở 12.000 vòng trong 2 phút. Chuyển cột lọc sang ống mới (1,5 ml Elution tube), và bổ sung 100 μ l nước không chứa nuclease (Nuclease free water) vào trên màng lọc và ly tâm ở 12.000 vòng trong 1 phút, loại bỏ cột lọc và thu lấy toàn bộ RNA ở bên dưới ống (Elution tube), để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo hoặc bảo quản mẫu RNA ở -70°C để dùng sau này.

Lượng RNA và độ tinh sạch của RNA có trong các mẫu nghiên cứu được xác định bằng cách đo mẫu RNA ở các bước sóng A230, A260, A280 và A320 ở máy Nanodrop, ngoài ra, chất lượng của RNA được tách chiết còn được kiểm tra trên gel agarose 1,5% và nhuộm màu với thuốc nhuộm Midori green.

Xác định sự biểu hiện gen DHDPS bằng kỹ thuật qRT-PCR

Tổng hợp sợi đầu tiên cDNA từ khuôn mẫu RNA theo kit của hãng Fermentas, (RevertAid H minus first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific) trong một ống PCR chứa 250 ng oligo dT primer, 0,5 mg RNA, bổ sung nước không chứa nuclease (nuclease free water) để đạt được thể tích trong ống là 12 μ l, ly tâm nhanh để trộn đều hỗn hợp mẫu, rồi ủ ở 70°C trong 5 phút. Mẫu được làm lạnh trong đá rồi tiếp tục thêm 4 μ l dung dịch đệm phản ứng, 1 μ l chất ức chế Riboblock Ribonuclease (20 U/ μ l), 2 μ l hỗn hợp dNTP (10 mM), 1 μ l RevertAid H Minus M-MuLV RT (200 U/ μ l) rồi ủ mẫu ở 42°C trong 1 phút để tổng hợp cDNA, sau đó ủ mẫu ở 70°C trong 10 giây để ngưng phản ứng. Phản ứng

qRT-PCR được tiến hành trên máy CFX96 Touch real-time PCR, sử dụng microplate (96 giếng), mỗi giếng chứa 10 μ l hỗn hợp đệm Promega (Promega mix), 4 μ l cDNA và 6 μ l hỗn hợp mồi DHDPS gồm 3 μ l mồi xuôi và 3 μ l mồi ngược có trình tự như sau:

Mồi xuôi: 5'TGTGTGGAGTGGGAACGATGATC3'

Mồi ngược: 5' GAGCAAGAGCCGTGTTCAAACC3'

Tách chiết và xác định hoạt độ của enzyme DHDPS

DHDPS được chiết từ lá ở các cây *M. crystallinum* trưởng thành của cả ba lô thí nghiệm 1, 2 và 3. Các mẫu lá được nghiền với đệm chiết (100 mM đệm potassium phosphate, pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA, 20% glycerol và 10 mM β -mercaptoethanol). Dịch chiết đồng nhất được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 20 phút và lọc qua giấy lọc Miracloth để loại bỏ các phân cận, thu lấy dịch chiết và kết tủa với 60% ammonium sulphate bão hòa trong 30 phút, rồi ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 20 phút. Phân kết tủa được thu và hòa tan trong đệm hòa tan chứa 50 mM phosphate pH 7,6, 1 mM Na₂EDTA, 20% glycerol và 10 mM sodium pyruvate và ủ ở 65°C trong 5 phút. Trong điều kiện này, hầu hết protein bị biến tính và được thu lấy sau khi ly tâm và bảo quản ở 20°C.

Hoạt độ của enzyme DHDPS được xác định theo phương pháp của Ghislain *et al.*, (1990, 1995) trong 1 ml dịch phản ứng chứa 100 mM Tris-HCl pH8, 35 mM pyruvate, 2 mM L-aspartic- β -semi-aldehyde (ASA) trung hòa, 35 μ l dung dịch aminobenzaldehyde (0,5 mg β -ABA/35 μ l ethanol tuyệt đối). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 60 phút, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung thêm 200 μ l of 12% trichloroacetic acid và tiếp tục ủ ở trong tối từ 60 - 90 phút, kết quả phản ứng sẽ làm chuyển màu của mẫu thí nghiệm và mức độ tạo màu đậm nhạt sẽ tùy thuộc vào lượng DHDPS có trong mỗi mẫu.

Hoạt độ của DHDPS được xác định bằng cách đo ở bước sóng 550 nm (Thu *et al.*, 2007). Hoạt độ riêng của DHDPS trong mẫu lá *M. crystallinum* ở các lô đối chứng và lô thí nghiệm được tính như lượng enzyme của mẫu cho phép tăng khả năng hấp thụ ở bước sóng 550 nm lên 0,001 ở mỗi phút trong sự hiện diện của L - ASA và được thể hiện bởi đơn vị (unit/mg protein) (Ellen *et al.*, 2013).

Hàm lượng protein trong mẫu được xác định theo phương pháp Bradford (1976), sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm mẫu protein chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái cây *M. crystallinum* trưởng thành

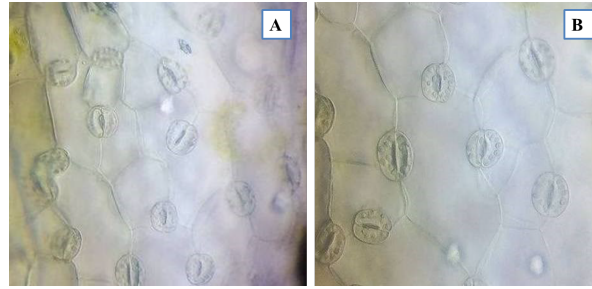
Chu kỳ sống của cây *M. crystallinum* thường trải qua năm giai đoạn khác nhau: nảy mầm, cây non, cây trưởng thành, ra hoa và tạo hạt (Patricia *et al.*, 1997). Trong nghiên cứu này, cây *M. crystallinum* trưởng thành (cây có 5-6 cặp lá và khoảng 2 tháng tuổi) được sử dụng làm nguồn vật liệu nghiên cứu (Hình 1).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy có nhiều tế bào khí khổng ở cả mặt trên và mặt dưới lá sau khi tiến hành loại bỏ tất cả các tế bào bàng quan bên ngoài của các lá trưởng thành và quan sát tiêu bản mẫu lá dưới kính hiển vi phân cực (Nikon, Eclipse 55i POL, vật kính 40) và đồng thời quan sát thấy đa số tế bào khí khổng ở trạng thái đóng (Hình 2). Điều này phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây, cho rằng ở giai đoạn trưởng thành, lúc cây chuẩn bị chuyển từ giai đoạn sinh trưởng dinh dưỡng sang giai đoạn sinh trưởng sinh sản, cây thường có khả năng biểu hiện đặc tính CAM, vào ban ngày khí khổng bị đóng để hạn chế sự thoát hơi nước, đồng thời mở khí khổng vào ban đêm để cố định CO₂ (Adam *et al.*, 1997).

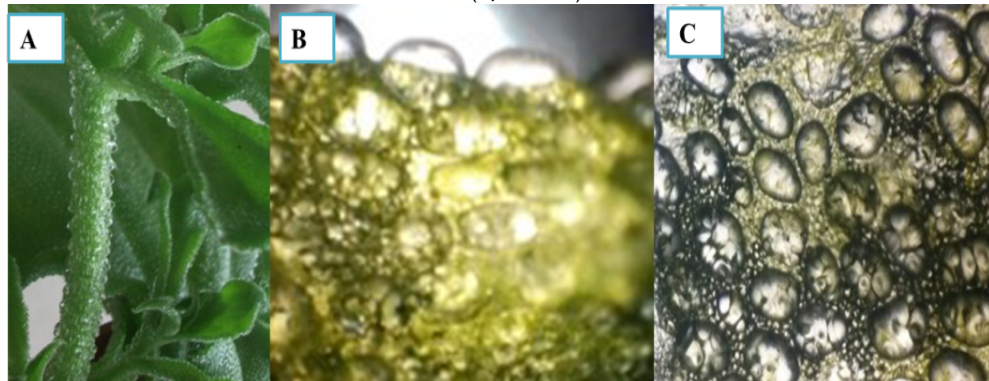
Ở giai đoạn trưởng thành, cây *M. crystallinum* thường có từ 4-6 cặp lá, trên thân cây bắt đầu xuất hiện rõ các tế bào bàng quan (Bladder cell). Đây là những tế bào đặt trung cho cây *M. crystallinum*, chúng phồng lên như những giọt sương và có thể quan sát bằng mắt thường (Hình 3A). Khi quan sát dưới kính hiển vi phân cực (Nikon, Eclipse 55i POL, vật kính 40), các tế bào bàng quan hiện rõ như những giọt nước và có kích thước lớn ở mép lá cây trưởng thành (Hình. 3B). Quan sát bề mặt lá cho thấy lá được bao phủ bởi một lớp tế bào bàng quan dày đặc. Có thể thấy rõ các tế bào bàng quan xếp lẫn lộn phủ kín bề mặt lá, không gối chồng lên nhau khi quan sát tiêu bản tế bào bàng quan dưới kính hiển vi, (Hình 3C). Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy các tế bào bàng quan có khả năng tích muối, tạo cho cây có khả năng thích nghi được với môi trường có độ mặn cao.



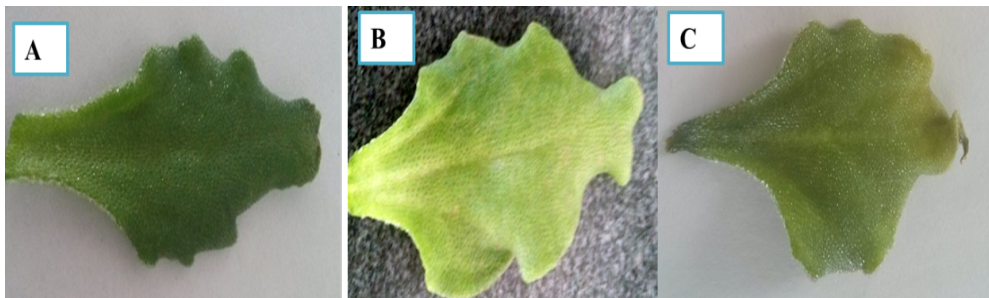
Hình 1. Cây *M. crystallinum* trưởng thành được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.



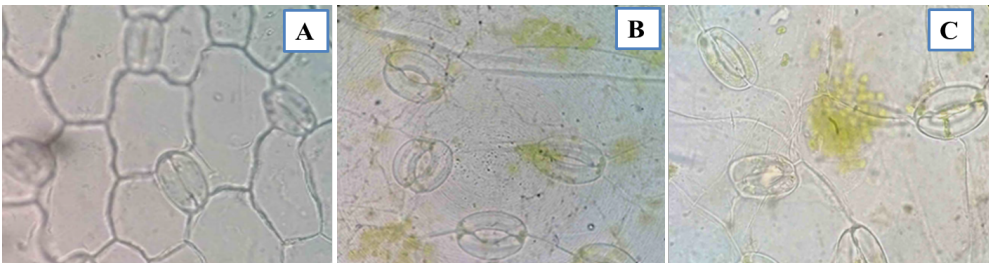
Hình 2. Hình thái khí khổng mặt trên (A) và mặt dưới (B) của lá cây *M. crystallinum* ở giai đoạn trưởng thành quan sát dưới kính hiển vi (vật kính 40).



Hình 3. Quan sát tế bào bạng quan ở cây *M. crystallinum* trưởng thành. (A): Tế bào bạng quan ở thân cây, quan sát bằng mắt thường. (B): Tế bào bạng quan mép thân cây, quan sát dưới kính hiển vi. (C): Tế bào bạng quan ở phần giữa thân cây, quan sát dưới kính hiển vi.



Hình 4. Sự biến đổi hình thái lá cây *M. crystallinum* ở giai đoạn trưởng thành trong quá trình xử lý stress nước, trong đó: (A): Mẫu đối chứng (tưới nước bình thường). (B): Mẫu không tưới nước sau 5 ngày. (C): Mẫu không tưới nước sau 10 ngày.



Hình 5. Sự biến đổi hình thái khí khổng ở mặt dưới lá *M. crystallinum* trong quá trình xử lý stress nước. (A): Mẫu đối chứng (tưới nước bình thường). (B): Mẫu không tưới nước sau 5 ngày. (C): Mẫu không tưới nước sau 10 ngày.

Ảnh hưởng của xử lý thiếu nước lên hình thái lá và khí khổng của cây *M. crystallinum* trưởng thành

Để đánh giá sự thay đổi khả năng tích nước trong đất suốt quá trình xử lý stress thiếu nước, chúng tôi tiến hành đo độ ẩm đất qua các giai đoạn khác nhau, kết quả thu được như đã trình bày ở bảng 1. Kết quả ở bảng 1 cho thấy ở điều kiện bình thường độ ẩm trong đất giao động trong khoảng $67,5 \pm 1,7\%$, khi xử lý stress thiếu nước sau 5 ngày độ ẩm đất giảm xuống còn khoảng $8,6 \pm 1,1$, và khi xử lý stress thiếu nước sau 10 ngày độ ẩm đất giảm xuống còn khoảng $7,8 \pm 2,6$.

Từ kết quả trên có thể rút ra kết luận là việc xử lý stress thiếu nước sau 5 ngày và 10 ngày đã làm cho độ ẩm đất giảm xuống đáng kể tuy nhiên, khi kéo dài thời gian xử lý stress thiếu nước lên đến 10 ngày, độ ẩm đất giảm nhẹ với giá trị biến động không đáng kể so với đất khi đã được xử lý stress thiếu nước sau 5 ngày.

Bảng 1. Độ ẩm đất trong quá trình xử lý stress nước.

Mẫu đất	Độ ẩm đất (%)
Đối chứng (tưới nước bình thường)	$67,5 \pm 1,7$
Sau 5 ngày xử lý stress thiếu nước	$8,6 \pm 2,6$
Sau 10 ngày xử lý stress thiếu nước	$7,8 \pm 1,1$

Bên cạnh sự biến đổi về độ ẩm đất, việc xử lý stress nước còn làm cho thân và lá cây bị mất nước dần nên lá có hiện tượng héo dần và rũ xuống (Hình 4). Ở trạng thái bình thường, khi cây được tưới nước đầy đủ, lá cây mọng nước và xanh tươi (Hình 4A). Sau khi cây bị xử lý stress nước 5 ngày, lá cây chỉ héo nhẹ (Hình 4B), nhưng nếu kéo dài thời gian xử lý stress (10 ngày), thì lá héo nhiều mềm và rũ xuống, ở mép lá và đỉnh lá bắt đầu teo và khô lại (Hình 4C).

Khi tách bỏ toàn bộ tế bào bằng quan bao bọc bên ngoài mẫu lá cây *M. crystallinum* trưởng thành điển hình ở cả ba lô thí nghiệm và quan sát tế bào khí khổng ở tiêu bản mẫu tách từ mặt dưới lá cho thấy việc xử lý stress nước đã làm biến dạng tế bào khí khổng. Trong khi phần lớn các tế bào khí khổng của cây đối chứng bị đóng lại (Hình 5A), thì ở các cây sau 5 ngày hoặc 10 ngày xử lý stress, hầu như tất cả các khí khổng đều ở trạng thái mở (Hình 5B, 5C).

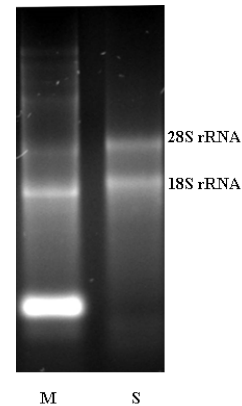
Kết quả thu được ở hình 5 cho thấy sự biến đổi hình thái khí khổng ở lá *M. crystallinum* trong quá trình xử lý stress nước khác biệt so với các loại cây

trong nhóm thực vật C3. Thông thường ban ngày, khí khổng của các loại cây C3 sẽ mở ra để trao đổi nước và hấp thụ CO₂ để tiến hành quang hợp nhưng khi cây bị tác động của các yếu tố bất lợi của môi trường thì khí khổng của chúng sẽ đóng lại để chống thoát nước và tăng cường khả năng chống chịu. Trong khi đó, biểu hiện hình thái của tế bào khí khổng ở cây *M. crystallinum* thì xảy ra theo hướng ngược lại, điều này có thể là do ở giai đoạn trưởng thành, cây *M. crystallinum* đã mang đặc tính CAM nên chúng có xu hướng chuyển sang cơ chế quang hợp của nhóm thực vật CAM, vì thế chúng có khả năng đóng khí khổng ban ngày để chống thoát hơi nước, đồng thời khi cây bị stress thì khí khổng của chúng lại mở ra vào ban ngày để tăng cường khả năng thích nghi với điều kiện bất lợi của môi trường.

Kiểm tra hàm lượng và chất lượng RNA tách từ lá cây *M. crystallinum* trưởng thành

Một lượng nhỏ RNA sau khi tách chiết và tinh sạch theo phương pháp đã được trình bày ở phần “Vật liệu và phương pháp”, sẽ được sử dụng để kiểm tra hàm lượng và chất lượng RNA trên máy Nanodrop.

Kết quả cho thấy hàm lượng RNA tổng số đạt 502,8 µg/µl, ngoài ra, tỷ lệ A260/A280 là 2.057 và tỷ lệ A260/ 2.171 là 2.171 chứng tỏ RNA được tách chiết có độ tinh sạch cao đồng thời mẫu RNA tách chiết không bị nhiễm protein và DNA. Ngoài ra, kết quả kiểm tra độ tinh sạch và chất lượng của RNA được tách chiết trên gel agarose 1,5% (Hình 6) cho thấy RNA thu được đảm bảo tiêu chuẩn để tiến hành qRT-PCR.



Hình 6. Chất lượng của RNA tách chiết từ lá cây *M. crystallinum* được kiểm tra trên gel agarose 1,5%, trong đó: M: Mẫu RNA chuẩn; S: Mẫu RNA của cây *M. crystallinum*.

Tiếp tục sử dụng phương pháp này để tách chiết

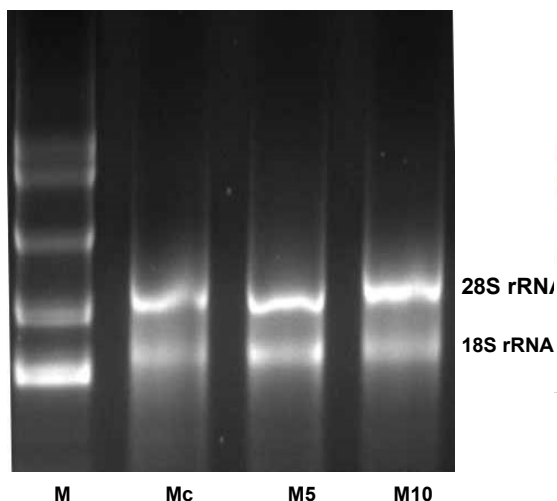
RNA ở lá cây đối chứng và cây xử lý stress nước sau 5 ngày và 10 ngày để tiến hành q RT-PCR, kết quả tách chiết RNA ở các mẫu được trình bày ở hình 7.

Ảnh hưởng của việc xử lý thiếu nước lên sự biểu hiện của gen mã hóa DHDPS trong lá cây *M. crystallinum* trưởng thành

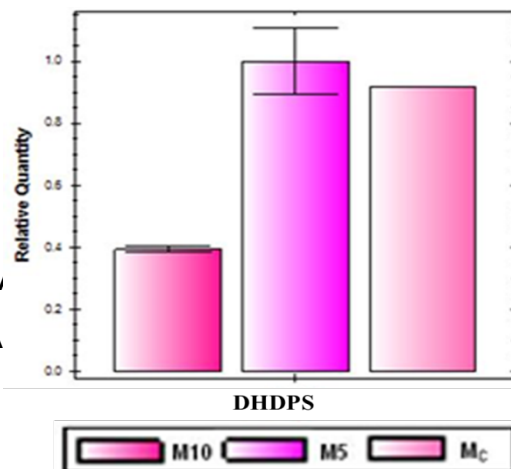
Sử dụng RNA tách chiết ở lá cây đối chứng và cây xử lý stress nước sau 5 ngày và 10 ngày để tiến hành q RT-PCR, kết quả thu được trình bày ở hình 8.

Kết quả ở hình 8 cho thấy việc xử lý stress nước đã ảnh hưởng đáng kể đến sự biểu hiện gen mã hóa DHDPS, trong đó việc xử lý stress nước trong một thời gian ngắn trong 5 ngày đã tăng nhẹ mức độ biểu hiện gen DHDPS so với mẫu đối chứng, tuy nhiên khi tiếp tục kéo dài thời gian xử lý stress nước lên đến 10 ngày thì mức độ biểu hiện gen DHDPS đã giảm đi đáng kể (Hình 8).

Khi tiến hành tách chiết và xác định hoạt độ của enzyme DHDPS trong lá cây *M. crystallinum*, chúng tôi thu được kết quả như được trình bày trong bảng 2. Kết quả thu từ bảng 2 cho thấy DHDPS được hiện diện trong các mẫu cây thuộc lô đối chứng và lô thí nghiệm, trong đó hoạt độ riêng của enzyme này dao động trong khoảng $117 \pm 5,08$ (unit/mg protein) ở mẫu đối chứng và tăng nhẹ so với mẫu sau 5 ngày bị xử lý stress nước nhưng khi tăng mức độ xử lý stress thiếu nước lên đến 10 ngày thì hoạt độ này bị giảm so với các cây ở lô đối chứng (Bảng 2). Từ kết quả thu được ở bảng 2 có thể thấy việc xử lý stress thiếu nước có ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme DHDPS trong cây *M. crystallinum*, tuy nhiên sự biến động này thay đổi tùy thuộc vào thời gian xử lý. Khi xử lý stress thiếu nước trong khoảng thời gian ngắn (5 ngày), hoạt độ enzyme DHDPS tăng nhẹ so với đối chứng, nhưng khi không tưới nước trong thời gian dài (10 ngày), cây mất nước nhiều và làm giảm đáng kể hoạt độ của enzyme DHDPS ở trong cây.



Hình 7. Hình ảnh RNA tách từ lá cây *M. crystallinum* trên gel agarose 1,5%. M: mẫu RNA chuẩn, Mc: Mẫu đối chứng (tươi nước bình thường), M5: Mẫu không tưới nước sau 5 ngày, M10: Mẫu không tưới nước sau 10 ngày.



Hình 8. Ảnh hưởng của stress nước lên sự biểu hiện gen mã hóa DHDPS ở lá cây *M. crystallinum*, trong đó, Mc: Mẫu đối chứng (tươi nước bình thường), M5: Mẫu không tưới nước sau 5 ngày và M10: Mẫu không tưới nước sau 10 ngày.

Bảng 2. Hoạt độ riêng của DHDPS trong lá *M. crystallinum* ở các cây có và không có xử lý stress thiếu nước.

Hoạt độ riêng của DHDPS (Unit /mg protein)		
Mẫu đối chứng (Lc)	Mẫu sau 5 ngày không tưới nước (D5)	Mẫu sau 10 ngày không tưới nước (D10)
$117 \pm 5,08$	$128 \pm 4,81$	$72 \pm 6,31$

KẾT LUẬN

Từ nghiên cứu này chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Lá cây *M. crystallinum* có chứa enzyme DHDPS và hoạt độ riêng của enzyme này trong cây có tưới nước đầy đủ dao động trong khoảng $117 \pm 5,08$ (unit/mg protein).

Khi các cây *M. crystallinum* trưởng thành bị xử lý stress thiếu nước sau 5 ngày hoặc 10 ngày, thì hình thái lá và các tế bào khí khổng có sự biến đổi khác biệt so với mẫu cây được tưới nước bình thường.

Xử lý stress thiếu nước trong 5 ngày làm tăng nhẹ hoạt độ của enzyme DHDPS và mức độ biểu hiện của gen DHDPS trong cây *M. crystallinum*, tuy nhiên khi cây không được tưới nước trong khoảng thời gian dài sẽ tác động gây giảm hoạt độ của DHDPS và ức chế sự biểu hiện của gen DHDPS so với các cây có tưới nước đầy đủ.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Giáo sư John Cushman, Đại học Nevada, Reno, Mỹ và Giáo sư Sakae Agarie, Đại học Kagawa, Nhật Bản đã cung cấp hạt giống *M. crystallinum* cho chúng tôi triển khai nghiên cứu này. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số "106-NN.02-2014.13".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bohnert HJ, Cushman JC (2000) The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *J Plant Growth Reg* 19: 334-346.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248 - 254.

Ellen E, Pieter VB, Tran TT, Greer A (2013) *Medicago truncatula* dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) enzymes display novel regulatory properties. *Plant Mol Biol* 81: 401-415.

Galili G (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* 7: 899-906.

Ghislain M, Frankard V, Jacobs M (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* 8:733-743.

Ghislain M, Frankard V, Jacobs M (1990) Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris*, a chloroplast-localized enzyme of the lysine pathway. *Planta* 180: 480-486.

Hong HTK, Nose A, Agarie S, Yoshida T (2008) Malate metabolism in *H. carnosus* mitochondria and its role in CAM photosynthesis. *J Exp Bot* 59: 1819-1827.

Patricia A, Done N, Shigehiro Y, Wendy CR, Jensen G, Bohnert HJ, Howard G (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol* 138: 171-190.

Tatsuya H, Makoto O, Sawahiko S, Hiromichi T (2014) Effects of water and salinity stress on the growth of Ice plant. *J Arid Land Stud* 161-164.

Thu TT, Dewaele E, Trung LQ, Claeys M, Jacobs M, Angenon G (2007) Increasing lysine levels in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) seeds through genetic engineering. *Plant Cell Tiss Organ Cul* 91:135-143.

EFFECTS OF WATER SHORTAGE STRESS ON THE MORPHOLOGY AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE (DHDPS) IN *MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM*

Hoàng Thị Kim Hồng¹, Phạm Thị Hồng Trang¹, Trương Thị Bích Phương¹, Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Ngô Thị Minh Thu¹, Nguyễn Thị Quỳnh Trang²

¹Hue University of Sciences, Hue University

²Hue University's College of Education, Hue University

SUMMARY

Lysine biosynthesis in plants has been studied extensively in order to improve the nutritional quality and provide the lysine for human life. In this process, dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) is one of the important enzymes that determine the accumulation of lysine in plants. This paper presents the initial results of the effect of water stress on morphology and expression of gene encoding dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *M. crystallinum* mature leaves have a lot of bladder

cells which are surrounded and coated as the dewdrops sparkling on the outside of the leaves and twigs. When the external bladder cells of mature leaves were removed we can see a lot of stomata at both sides of the leaves under microscope with the objective lens 40 (Nikon, Eclipse 551 POL). When water stress treated after 5 days and 10 days, leaf morphology, cytoplasm and stomata of *M. crystallinum* mature plants were changed comparing with the control plants. The RNA was extracted from *M. crystallinum* leaves of both treated and untreated stress water samples. These RNA were used as a template to synthesize cDNA and analysis with specific primers by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that water stress treatment had caused a change in the gene expression of DHDPS in treated plants significantly reduced the DHDPS gene expression in *M. crystallinum* leaves. In addition, a significant amount of DHDPS enzyme was measured in *M. crystallinum* leaves, and the activity of that was changed by different water-stress treatment times.

Keywords: *Bladder cell, Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), gene encoding DHDPS, M. crystallinum, stoma, water stress treatment*