

## KHẢO SÁT SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN *GmHK06* VÀ *GmRR34* DƯỚI ĐIỀU KIỆN THIẾU NƯỚC Ở HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG MTD777-2 VÀ DT20

Hoàng Thị Lan Xuân, Nguyễn Hồ Thủy Dung, Nguyễn Bình Anh Thư, Nguyễn Phương Thảo\*

Trường Đại học Quốc tế, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh, \*npthao@hcmiu.edu.vn

**TÓM TẮT:** Hệ thống hai thành phần (Two-component systems-TCSs) bao gồm những yếu tố đã được chứng minh tham gia trong quá trình điều hòa các đáp ứng ở thực vật trong điều kiện thiếu nước. Theo nghiên cứu trước đây của chúng tôi, MTD777-2 là giống đậu tương có các đáp ứng sinh lý hạn tốt hơn giống DT20. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định mức độ biểu hiện của hai thành viên họ TCS mã hóa cho nhân tố dạng histidine kinase *GmHK06* và nhân tố điều hòa đáp ứng *GmRR34* ở hai giống đậu địa phương này. Các mẫu RNA được tách chiết từ rễ và chồi của cây trồng ở điều kiện thường và điều kiện xử lý hạn 15 ngày được dùng để tổng hợp cDNA phục vụ cho việc đánh giá biểu hiện gen thông qua phản ứng định lượng Real-time PCR. Kết quả phân tích cho thấy, khi thiếu nước, sự biểu hiện của *GmHK06* bị ức chế ở rễ và tăng ở chồi, đặc biệt tăng nhiều ở MTD777-2. Trong khi đó, kích thích hạn dẫn đến sự gia tăng đáng kể sự biểu hiện của *GmRR34* ở cả hai giống. Những thông tin này cho thấy, trong khi *GmHK06* là nhân tố điều hòa đặc hiệu theo mô thực vật, *GmRR34* là nhân tố điều hòa dương tính tiềm năng chống chịu được stress hạn ở cả mô rễ và chồi. Do đó, những thành viên họ TCS này có thể được xem như những gen ứng viên dùng trong các ứng dụng kỹ thuật di truyền và cần được tìm hiểu sâu hơn trong tương lai.

*Từ khóa:* Đậu tương, *GmHK06*, *GmRR34*, chịu hạn.

### MỞ ĐẦU

Đậu tương (*Glycine max*) là một trong những cây trồng nông nghiệp quan trọng ở Việt Nam. Không chỉ là nguồn thực phẩm phổ biến của con người và động vật, đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất và được dùng trong sản xuất năng lượng sinh học. Tuy nhiên, đậu tương có đặc tính chịu hạn kém [1]. Stress hạn là một yếu tố môi trường bất lợi đối với thực vật vì làm giảm sinh khối, chiều cao cây và sản lượng hạt [5]. Về mặt sinh học, nhằm giảm tối đa sự ảnh hưởng của stress hạn, thực vật đã kích hoạt nhiều cơ chế bảo vệ bao gồm những phản ứng sinh lý và chuyển hóa. Quá trình này của thực vật bao gồm sự tiếp nhận các tín hiệu stress ban đầu, sự truyền tín hiệu stress, điều hòa một số gen nhất định và cuối cùng kích hoạt các đáp ứng có lợi cho cây.

Nhiều nghiên cứu thực hiện ở *Arabidopsis*, *Oryza sativa* và *Saccharomyces cerevisiae* đều gợi ý về sự tham gia của hệ thống hai thành phần (Two-component systems hay TCSs) trong việc điều khiển con đường truyền tín hiệu stress và điều hòa phân tử của nhiều quá trình sinh học khác nhau, bao gồm những điều hòa đáp ứng hạn [9]. Sự cấu thành cơ bản của hệ thống hai

thành phần là một tổ hợp của hai loại protein: histidine kinase (HK hay protein cảm biến) và điều hòa đáp ứng (response regulator - RR hay protein tiếp nhận). Thông qua sự chuyển đổi gốc phot-pho từ His thuộc protein cảm biến sang Asp thuộc protein tiếp nhận, cấu hình không gian của protein tiếp nhận bị thay đổi, dẫn đến kết quả là sự tương tác với các protein khác hoặc sự liên kết với DNA [11, 12]. Đối với quá trình đa bước của hệ thống phản ứng hai thành phần, histidine kinase ở dạng lai bao gồm cả vùng (domain) cảm biến và vùng tiếp nhận hoặc/và có thêm sự hiện diện của protein thứ ba được gọi là histidine phosphotransfer (HPT) giữ chức năng như một nhân tố trung gian trong việc chuyển gốc phot-pho từ protein cảm biến đến protein tiếp nhận [2, 4, 10, 13].

Trong hệ gen đậu tương, ít nhất 21 HK, 13 HPT bao gồm loại xác thực và giả định, và 49 RR thuộc các dạng A, B, C và giả định đã được xác nhận [6, 10]. Khi nghiên cứu trên giống đậu tương Williams 82, nhiều thành viên thuộc hệ thống này có sự thay đổi đáng kể về mức độ biểu hiện gen dưới tác động của stress hạn, trong đó có gen *GmHK06* (mã hóa protein dạng HK) và gen *GmRR34* (mã hóa protein dạng RR)

[6]. Vì thế, chúng tôi tập trung tìm hiểu sự thay đổi biểu hiện của hai gen này trên hai giống đậu tương địa phương Việt Nam, MTD777-2 và DT20. Dựa trên các phân tích sinh lý ở những nghiên cứu đã thực hiện trước đây, MTD777-2 và DT20 có kiểu hình đáp ứng hạn khác nhau. Kết quả phân tích phân tử thu được từ nghiên cứu này cho thấy dưới điều kiện hạn, trong khi biểu hiện của *GmHK06* thay đổi theo mô, *GmRR34* lại tăng cường biểu hiện ở cả rễ và chồi của hai giống khảo sát. Điều này chỉ ra rằng *GmHK06* và *GmRR34* lần lượt là nhân tố điều hòa theo mô và nhân tố điều hòa dương tính tiềm năng đối với đáp ứng stress hạn.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu, điều kiện trồng và điều kiện xử lý hạn

Hai giống đậu tương địa phương (*Glycine max*), MTD777-2 và DT20, được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ Việt Nam. Cây được trồng ở điều kiện nhà lưới bao gồm nhiệt độ ngày/đêm 28/25°C, quang kỳ 12 h và độ ẩm 60%. Để thực hiện thí nghiệm xử lý hạn, cây con 12 ngày tuổi được chia làm 2 nhóm (10 cây/nhóm): 1 nhóm tiếp tục được tưới nước bình thường và 1 nhóm không tưới nước 15 ngày. Sau thời gian xử lý, rễ và chồi được thu nhận và lưu trữ ngay lập tức trong nito lỏng nhằm tránh sự phân hủy của RNA.

### Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Các mẫu thu thập được nghiền trong nito lỏng. RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol (Invitrogen, Hoa Kỳ) và Bộ tách chiết RNA (PureLink RNA Mini Kit, Invitrogen, Hoa Kỳ), với sự loại bỏ DNA bằng DNaseI (On-column PureLink DNase, Invitrogen, Hoa Kỳ). Các mẫu RNA được kiểm tra nồng độ bằng máy đo quang phổ (Biotek, Hoa Kỳ) trước khi 1 µg RNA tổng được dùng để tổng hợp cDNA bằng Bộ tổng hợp cDNA (Invitrogen, Hoa Kỳ). Quy trình thao tác được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### Real-time PCR định lượng và phân tích kết quả

Tổng thể tích của mỗi phản ứng Real-time PCR định lượng là 25 µl, bao gồm SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Hoa Kỳ),

khuôn cDNA và một cặp primer thiết kế đặc hiệu cho *Fbox* hoặc *60s* hoặc *GmHK06* hoặc *GmRR34* theo các nghiên cứu trước với nồng độ sau cùng là 0,4 µM [6, 7]. Các phản ứng (lặp lại 3 mẫu cho mỗi thiết kế thí nghiệm) được thực hiện bằng máy Realplex Eppendorf (Đức). Chu trình chạy phản ứng bao gồm 10 phút ở 95°C, 40 chu kỳ của 95°C (15 giây) và 60°C (1 phút). Để kiểm tra số sản phẩm được khuếch đại ở mỗi phản ứng, phân tích đường cong nóng chảy DNA (dissociation melting curves) được thực hiện bằng cách giữ ở nhiệt độ 95°C trong 15 giây trước khi gia tăng nhiệt đều từ 60°C lên 95°C. Phương pháp delta delta  $C_t$  được sử dụng để so sánh tương đối mức độ biểu hiện gen ở các mô, các điều kiện trồng hoặc ở các giống khác nhau [8]. Sự thay đổi biểu hiện giữa điều kiện hạn so với điều kiện thường được xem là có ý nghĩa nếu các mức độ biểu hiện trung bình có tỉ lệ khác biệt tối thiểu là 2 lần và có giá trị phân tích thống kê bằng phương pháp Student-t test với  $p < 0,05$ .

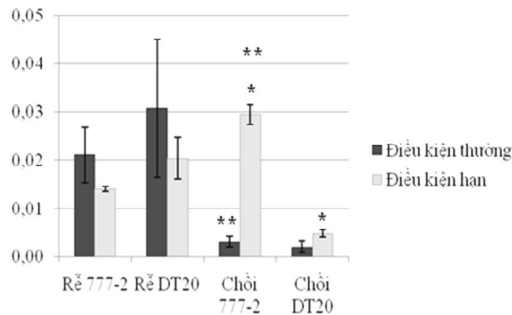
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Xác định gen tham chiếu

Để có thể so sánh chính xác sự thay đổi dưới tác động hạn và sự khác nhau trong biểu hiện của gen mục tiêu giữa các mẫu bằng phản ứng real-time PCR định lượng tương đối (relative qRT-PCR), việc chọn gen tham chiếu (reference gene) để chuẩn hóa (normalized) rất quan trọng. Yêu cầu của gen dùng để chuẩn hóa là gen phải luôn có sự biểu hiện ổn định cao giữa các mẫu so sánh [3, 7]. Theo nghiên cứu của Le et al. (2012) [7], *Fbox* và *60s* là hai gen có sự biểu hiện ổn định nhất trong các thí nghiệm stress hạn, thậm chí hơn cả *CYP2* là gen thường được sử dụng để chuẩn hóa trước đó khi làm trên đối tượng đậu tương. Do đó, để xác định gen chuẩn hóa nào sẽ được dùng, trước hết chúng tôi khảo sát sự biểu hiện của hai gen này ở MTD777-2 và DT20. Kết quả qRT-PCR cho thấy, *Fbox* có sự biểu hiện tương đối ổn định hơn ở cả hai loại mô khi so sánh giữa hai điều kiện, trong đó sự ổn định nhất được thấy ở rễ của giống DT20 (bảng 1). Vì vậy, *Fbox* được chúng tôi sử dụng làm gen chuẩn hóa trong nghiên cứu này.

**Bảng 1.** Biểu hiện tương đối của *Fbox* và *60s* ở mô chồi và rễ của MTD777-2 và DT20 ở điều kiện hạn so với điều kiện thường (sự ít khác biệt nhất được in đậm)

Gen	Giống đậu tương	Biểu hiện tương đối ở điều kiện hạn so với điều kiện bình thường (số lần)	
		Chồi	Rễ
<i>Fbox</i>	MTD777-2	1,25 ± 0,99	<b>0,72 ± 0,09</b>
	DT20	<b>1,00 ± 0,31</b>	0,24 ± 0,12
<i>60s</i>	MTD777-2	1,59 ± 0,53	0,68 ± 0,01
	DT20	1,58 ± 0,80	0,48 ± 0,07

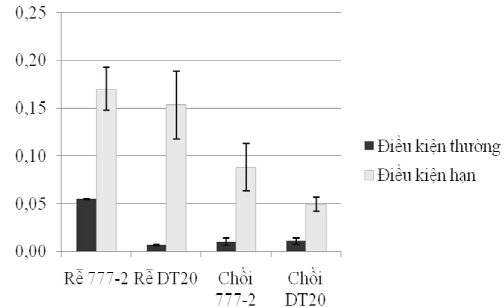


**Hình 1.** Biểu hiện của gen *GmHK06* ở mô rễ và chồi được phân tích bằng phương pháp real-time PCR định lượng. Gen *Fbox* được dùng để chuẩn hóa. Sự khác biệt đáng kể trong biểu hiện *GmHK06* được ghi nhận ở mô chồi giữa hai giống ở điều kiện hạn (\*) và ở mô chồi của MTD777-2 trồng ở điều kiện thường và điều kiện hạn (\*\*).

#### Sự biểu hiện của gen *GmHK06* và *GmRR34*

Những phân tích về sinh lý và hình thái trước đó cho thấy MTD777-2 có ưu thế hơn DT20 về các đáp ứng hạn, cụ thể như hệ thống rễ bên phát triển hơn, tăng trưởng của rễ chính và của chồi ít bị ảnh hưởng hơn bởi điều kiện thiếu nước [14]. Để tiếp tục tìm hiểu sự khác biệt ở mức độ phân tử, sự biểu hiện của gen *GmHK06* và *GmRR34* là hai thành viên thuộc họ TCSs được cho là có tham gia vào các đáp ứng hạn được chọn để kiểm tra [6]. Với mục đích khảo sát sự thay đổi biểu hiện dưới tác động hạn dài ngày tương tự như điều kiện được trồng ở đồng ruộng, MTD777-2 và DT20 được xử lý hạn 15 ngày. Theo kết quả qRT-PCR thu được, nhìn chung biểu hiện của gen *GmHK06* (mã hóa protein tương đồng với CK12/AHK5 ở *Arabidopsis*) giảm ở rễ nhưng lại tăng ở chồi khi bị stress (hình 1). Điều này cho thấy vai trò

của *GmHK06* ở rễ và chồi có khác nhau. Trong khi mức độ giảm biểu hiện không đáng kể ( $p > 0,05$ ), chỉ khoảng 1,5 lần ở rễ của MTD777-2 và DT20, *GmHK06* tăng cường biểu hiện đáng kể ở chồi MTD777-2 lên đến 9 lần ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, sự gia tăng biểu hiện 2 lần của gen này ở DT20 không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ) (hình 1, bảng 2). Như vậy, khi thiếu nước, giống có đáp ứng sinh lý thích nghi đối với hạn tốt hơn, MTD777-2, có mức độ tăng sự biểu hiện của *GmHK06* ở chồi mạnh mẽ hơn rất nhiều so với mức độ tăng biểu hiện của gen này ở chồi của DT20. Đây cũng là sự khác biệt đáng kể duy nhất khi so sánh mức độ biểu hiện của gen *GmHK06* trong cùng một loại mô với điều kiện xử lý hạn giống nhau.



**Hình 2.** Biểu hiện của gen *GmRR34* ở mô rễ và chồi được phân tích bằng phương pháp real-time PCR định lượng. Gen *Fbox* được dùng để chuẩn hóa.

Đối với *GmRR34* (mã hóa protein tương đồng với ARR24 ở *Arabidopsis*), chiều hướng tăng biểu hiện gen được nhìn thấy rõ ràng dưới tác động của hạn (hình 2). So với điều kiện thường, mức độ tăng biểu hiện đáng kể ( $p < 0,05$ ) ở các mô lần lượt là 3 lần (rễ MTD777-2), 23 lần

(rễ DT20), 9 lần (chồi MTD777-2) và 5 lần (chồi DT20) (hình 2, bảng 2). Một ghi nhận khác là trong điều kiện cây được tưới nước đầy đủ,

*GmRR34* có sự biểu hiện gen mạnh nhất ở rễ MTD777-2 (gấp 8 lần so với rễ DT20 và khoảng 5 lần so với chồi của 2 giống đậu tương).

Bảng 2. Biểu hiện gen dưới tác động của stress hạn 15 ngày ở hai giống MTD777-2 và DT20

	Sự thay đổi biểu hiện gen (lần) (điều kiện hạn so với điều kiện thường)					
	MTD777-2		DT20		Williams 82 <sup>(a)</sup>	
	Chồi	Rễ	Chồi	Rễ	Chồi	Rễ
<i>GmHK06</i>	9,4	-1,5	2,3	-1,5	-16,8	-4,9
<i>GmRR34</i>	8,7	3,1	4,6	23,3	23,6	19,6

<sup>(a)</sup>Kết quả theo nghiên cứu của Le et al. (2011) [6], xử lý hạn 10 tiếng. Dấu trừ thể hiện sự giảm biểu hiện. Sự thay đổi biểu hiện giữa điều kiện hạn so với điều kiện thường được xem là có ý nghĩa về mặt thống kê nếu mức độ khác biệt tối thiểu là 2 lần với  $p < 0,05$  (giá trị in đậm).

Tương tự như kết quả trong nghiên cứu của Le et al. (2011) [6] khi khảo sát sự biểu hiện hai gen này trên giống Williams 82 được tưới nước đầy đủ, sự biểu hiện của gen *GmHK06* và *GmRR34* ở giống MTD777-2 chủ yếu hoạt động mạnh ở rễ. Khi được xử lý ngắn hạn (10 tiếng) ở giống Williams 82, gen *GmRR34* cũng tăng sự biểu hiện ở các mô [6]. Tuy nhiên, ở điều kiện này, biểu hiện của gen *GmHK06* ở Williams 82 lại giảm đáng kể ở cả chồi và rễ với sự ức chế nhiều hơn ở chồi (bảng 2) [6]. Điều này cho thấy, biểu hiện gen có thể thay đổi tùy theo độ dài thời gian xử lý hạn.

#### KẾT LUẬN

Theo kết quả thu được từ nghiên cứu này, tác động của hạn dài ngày làm thay đổi sự biểu hiện của *GmHK06* (giảm ở rễ và tăng ở chồi) và *GmRR34* (tăng mạnh ở cả rễ và chồi). Tuy nhiên, chồi MTD777-2 có sự tăng cường biểu hiện *GmHK06* đáng kể hơn so với chồi DT20 khi bị hạn và rễ MTD777-2 có sự biểu hiện *GmRR34* mạnh hơn so với rễ DT20 ở điều kiện trồng bình thường. Tất cả những thông tin này cho thấy *GmHK06* và *GmRR34* có thể đóng góp vào việc giúp cho MTD777-2 có những thích nghi tốt hơn với stress hạn, trong đó *GmHK06* là nhân tố điều hòa theo mô và *GmRR34* là nhân tố điều hòa dương tính đáp ứng với kích thích vô sinh này.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.16-2011.37.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Clement M., Lambert A., Herouart D., Boncampagni E., 2008. Identification of new upregulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene*, 426: 15-22.
- Grefen C., Harter K., 2004. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, 219: 733-742.
- Gutierrez L., Mauriat M., Guenin S., Pelloux J., Lefebvre J. F., Louvet, R., Rusterucci C., Moritz T., Guerinéau F., Bellini C., Wuytswinkel O. V., 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotech. J.*, 6: 609-618.
- Hass C., Lohrmann J., Albrecht V., Sweere U., Hummel F., Yoo S. D., Hwang I., Zhu T., Schäfer E., Kudla J., Harter K., 2004. The response regulator 2 mediates ethylene signaling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 23: 3290-3302.
- Lam-Son P. T., Mochida K., 2010. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. *Funct. Integr. Genomics*, 10: 447-462.
- Le D. T., Nishiyama R., Watanabe Y., Mochida K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Lam-Son P. T., 2011.

- Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. *DNA Res.*, 18: 17-29.
7. Le D. T., Aldrich D. L., Valliyodan B., Watanabe Y., Chien V. H., Nishiyama R., Guttikonda S. K., Truyen N. Q., Gutierrez-Gonzalez J. J., Lam-Son P. T., Henry T. N., 2012. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. *PLoS One*, DOI :10.1371/journal.pone.0046487.
  8. Livak K. J., Schmittgen T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*. 25: 402-408.
  9. Lohrmann J., Harter K., 2002. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol.*, 128: 363-369.
  10. Mochida K., Yoshida T., Sakurai T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Lam-Son P. T., 2010. Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA Res.*, 17: 303-324.
  11. Oka A., Sakai H., Iwakoshi S., 2002. His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Sys.*, 77: 383-391.
  12. Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N., 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 183-215.
  13. West A. H., Stock A. M., 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems. *Trends Biochem. Sci.*, 26: 369-376.
  14. Xuan H. T. L., Thu N. B. A., Thao, N. P., 2013. Physiological and molecular studies on drought responses in two local soybean varieties-MTD777-2 and DT20. National Biotechnology Conference, Hanoi, 27<sup>th</sup> September, 2:1157-1161.

### A STUDY ON THE EXPRESION PATTERNS OF *GmHK06* AND *GmRR34* UPON WATER DEFICIT IN MTD777-2 AND DT20

**Hoang Thi Lan Xuan, Nguyen Ho Thuy Dung, Nguyen Binh Anh Thu, Nguyen Phuong Thao**

International University, VNU-HCMC

#### SUMMARY

Two-component systems (TCSs) form a distinct family of factors which have been reported to participate in the regulation of plant responses upon water-limiting conditions. Previous studies conducted by our group have shown that MTD777-2 had better drought-responsive capacities than DT20. Therefore, in this research, we would like to identify the tissue-specific expression patterns of two TCS members genes encoding a histidine kinase *GmHK06* and a response regulator *GmRR34* in these two local soybean varieties. The isolated RNA samples from root and shoot of plants grown under normal condition and 15-day drought treatment were used for cDNA synthesis followed by quantitative Real-time PCR. The analyses indicated that under the water stress, *GmHK06* expression was repressed in root yet up-regulated in shoot, especially with a higher level in the shoot of MTD777-2. Meanwhile, there was a significant increase in the gene expression of *GmRR34* in tissues of both cultivars. These findings suggested that while *GmHK06* was a tissue-dependent factor, *GmRR34* was a positive regulator against drought stress. Therefore, they could be considered as potential candidate genes for genetic engineering application that need to be deeply studied in future.

*Keywords:* *Glycine max*, drought stress, *GmHK06*, *GmRR34*.

*Ngày nhận bài:* 15-7-2013