

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN GEN VÀ XÂY DỰNG MÔ HÌNH CẤU TRÚC KHÔNG GIAN CỦA PROTEIN GIÀU METHIONINE Ở CÂY SẮN BẰNG CÔNG CỤ TIN SINH HỌC

Nguyễn Hữu Kiên¹, Tạ Thị Diệu Linh¹, Chu Đức Hà^{2*}, Nguyễn Hà My³,
La Việt Hồng³, Lê Thị Ngọc Quỳnh⁴, Nguyễn Quỳnh Anh⁵,
Bùi Thị Thu Hương⁵, Đồng Huy Giới⁵

TÓM TẮT

Thực vật cần điều kiện môi trường tối ưu để sinh trưởng và phát triển nên cũng là nhóm bị chịu ảnh hưởng nhiều nhất bởi các stress phi sinh học, như nóng, lạnh, mặn, hạn hán và lũ lụt. Trong đó, các protein giàu methionine (MRP) là một trong những phân tử dễ bị ảnh hưởng bởi những stress phi sinh học này. Ở nghiên cứu này, các gen mã hóa 52 MRP chưa rõ chức năng trên đối tượng cây sắn (*Mahibot esculenta*), giống mô hình KU50 có mức độ biểu hiện khác nhau ở các dữ liệu RNA-Seq trong điều kiện xử lý mặn, hạn, thiếu hụt dinh dưỡng và xử lý polyethylene glycol 6000. Kết quả đã xác định được tổng số 28 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng nhưng có mức độ biểu hiện đáp ứng trong ít nhất một điều kiện xử lý bất lợi ($|\text{fold-change}| \geq 2$). *Manes.18G048000* được xác định là gen đáp ứng trong tất cả các điều kiện stress phi sinh học, trong khi *Manes.10G129200* và *Manes.S070600* là hai gen có đáp ứng tăng (41,3-lần) và giảm mạnh nhất (-82,3-lần) ở lá khi xử lý hạn. Phân tích cho thấy rất nhiều các yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng hormone, đặc biệt là yếu tố đáp ứng abscisic acid, jasmonic acid và ethylene, đã được tìm thấy trên vùng promoter của 28 gen đáp ứng bất lợi. Xây dựng mô hình 3D cho thấy các MRP chủ yếu được cấu tạo từ các dạng xoắn alpha kết hợp với nếp gấp beta. Tóm lại, kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp những dẫn liệu quan trọng nhằm để xuất ra các gen ứng viên cho phân tích chức năng gen liên quan đến chống chịu stress phi sinh học ở cây sắn.

Từ khóa: Protein giàu methionine, cây sắn, biểu hiện, stress phi sinh học, tin sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, canh tác nông nghiệp đang chịu nhiều tác động tiêu cực do biến đổi khí hậu toàn cầu kéo theo những stress phi sinh học, điển hình như bất lợi về nhiệt độ (nóng, lạnh), nồng độ muối (đất nhiễm mặn) và nước (ngập úng, hạn hán). Những stress phi sinh học ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây trồng, từ đó gây thách thức cho sản xuất nông nghiệp bền vững và tình hình an ninh lương thực (Ray *et al.*, 2019). Trong số các cây trồng quan trọng ở Việt Nam, sắn (*Manihot esculenta*), mặc dù dễ sinh trưởng và có khả năng chống chịu khá, nhưng vẫn chịu ảnh hưởng bởi tình trạng biến đổi khí hậu (Malik *et al.*, 2020). Với nhiều mục đích sử dụng khác nhau, canh tác sắn được xem là một trong những giải pháp tăng thu nhập cho các nông hộ tại địa phương hiện nay. Vì vậy, tìm hiểu về cơ chế đáp ứng stress phi sinh học ở cấp độ phân tử ở cây sắn có thể là

chìa khóa để hướng đến canh tác bền vững, thích ứng với biến đổi khí hậu trong tương lai.

Trong nghiên cứu trước đây, những protein miễn cảm với bất lợi phi sinh học, cụ thể là protein giàu methionine (MRP) đã được tìm hiểu và phân tích trên cơ sở dữ liệu của giống sắn KU50 (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021). Đây là nhóm protein rất dễ bị tác động bởi sự dư thừa của các dạng ôxi phản ứng nội bào gây ra bởi stress phi sinh học (Huang *et al.*, 2019). Cụ thể, tổng số 155 MRP, với kích thước phân tử ≥ 95 axit amin (aa) và hàm lượng Met $\geq 6\%$ đã được tìm thấy ở hệ protein của sắn (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021). Trong đó, $^{52}/_{155}$ MRP chưa rõ chức năng đã được phân tích đặc tính cấu trúc và vị trí phân bố (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021). Vì vậy, việc phân tích mức độ phiên mã của 52 gen này sẽ cung cấp những dẫn liệu khoa học định hướng cho phân tích chức năng gen.

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

³ Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Đại học Sư phạm Hà Nội 2

⁴ Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học Thủy lợi

⁵ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

* Tác giả chính: Email: cd.ha@vnu.edu.vn

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khai thác mức độ biểu hiện của 52 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng ở sản dựa trên việc tái phân tích các dữ liệu microarray trong điều kiện xử lý stress phi sinh học. Bên cạnh đó, vùng promoter của các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng được phân tích yếu tố điều hòa *cis*- liên quan đến tín hiệu hormone. Đồng thời, mô hình cấu trúc không gian của các phân tử MRP được phân tích dựa trên công cụ tin sinh học.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hệ gen, hệ protein của sản (mã dữ liệu: PRJNA234389) (Bredeson *et al.*, 2016) được khai thác trên Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012) và NCBI. Hệ phiên mã của sản ở mẫu rễ và lá xử lý mặn (GSE84715) (Onsaya *et al.*, 2017), mẫu lá xử lý hạn (GSE98537), mẫu lá đỉnh, lá bên, lá trưởng thành và rễ xử lý thiếu hụt NPK (GSE89971) (Utsumi *et al.*, 2017), mẫu mô sẹo phôi hóa xử lý polyethylene glycol (PEG) 6000 (GSE93098) (Ding *et al.*, 2017) được khai thác trên NCBI GEO.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích dữ liệu RNA-Seq: Các dữ liệu hệ phiên mã của sản khai thác trên NCBI GEO được phân tích bằng thuật toán geomean theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2018). Mức độ biểu hiện của gen trong điều kiện bất lợi được tính bằng giá trị fold-change, là số lần thay đổi của giá trị FPKM của gen ở mẫu xử lý so với đối chứng. Theo đó, gen có mức độ phiên mã đáp ứng với bất lợi được quy định với giá trị $|\text{fold-change}| \geq 2$ theo nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2018; Cuong *et al.*, 2018). Mức độ biểu hiện sau đó được biểu diễn bằng biểu đồ nhiệt (heatmap) thông qua công cụ gplots của ngôn ngữ R (Liao *et al.*, 2019).

- Phương pháp khai thác vùng promoter: Mã định danh gen khai thác trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021) được sử dụng để truy vấn trên hệ gen của sản (Bredeson *et al.*, 2016) trên NCBI và Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Theo đó, trình tự 1000 bp ở vùng phía trước vị trí mã mở đầu (-ATG-) của từng gen được thu thập cho phân tích *in silico* tiếp theo, dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Cuong *et al.*, 2018).

- Phương pháp phân tích yếu tố điều hòa *cis*:- Các yếu tố đáp ứng tín hiệu hormone được khảo sát trên đoạn trình tự 1000 bp của vùng promoter của từng gen dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Cuong *et al.*, 2018). Theo đó, yếu tố đáp ứng abscisic acid (ABRE) đặc trưng bởi đoạn -ACGTG-, hai yếu tố đáp ứng jasmonic acid, bao gồm CGTCA-motif và TGACG-motif, hai yếu tố đáp ứng gibberellin, bao gồm GARE-motif (đặc trưng bởi đoạn -TCTGTTG-) và P box (đặc trưng bởi đoạn -CCTTTTG-), TCA-element (đặc trưng bởi đoạn -CCATCTTTT- hoặc -CAGAAAAGGA-) đáp ứng salicylic acid, hai yếu tố đáp ứng auxin, bao gồm TGA-element (đặc trưng bởi đoạn -AACGAC-) và AuxRR-core (đặc trưng bởi đoạn -GGTCCAT-), và yếu tố đáp ứng ethylene (đặc trưng bởi đoạn -ATTTTAAA-) mô tả trong nghiên cứu gần đây (Chu *et al.*, 2018) được tìm kiếm trên vùng promoter bằng công cụ BioEDIT (Hall, 1999) và PlantCARE.

- Phương pháp phân tích cấu trúc không gian của protein: Trình tự protein đầy đủ khai thác trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021) được sử dụng để truy vấn trên Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). Theo đó, cấu trúc bậc 2, bao gồm xoắn alpha, nếp gấp beta và đoạn helix xuyên màng, và cấu trúc không gian của protein được mô phỏng (Kelley *et al.*, 2015).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 11/2020 đến tháng 9/2021. Các phân tích tin sinh học được tiến hành tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Đại học Công nghệ (Đại học Quốc gia Hà Nội), Đại học Thủy lợi và Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

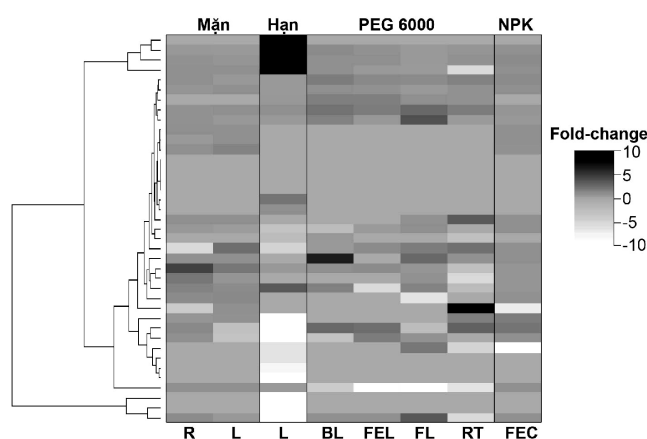
3.1. Phân tích mức độ biểu hiện trong điều kiện bất lợi của gen mã hóa MRP ở sản

Để tìm hiểu mức độ đáp ứng của 52 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021) ở các cơ quan/bộ phận trong điều kiện xử lý bất lợi, 4 dữ liệu RNA-Seq, lần lượt bao gồm GSE84715 (xử lý mặn) (Onsaya *et al.*, 2017), GSE98537 (xử lý hạn), (GSE89971) (thiếu hụt NPK) (Utsumi *et al.*, 2017) và GSE93098 (xử lý PEG 6000) (Ding *et al.*, 2017) đã được khai thác dựa trên NCBI GEO. Dựa trên giá trị phiên mã biến thiên ở mẫu xử lý so với đối chứng, các gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng

có biểu hiện đáp ứng đa dạng tại các vị trí khác nhau trong các điều kiện khác nhau.

Trong điều kiện xử lý mặn GSE84715 (Onsaya *et al.*, 2017), đa số ($^{46}/_{52}$) gen có biểu hiện thay đổi không đáng kể ($|\text{fold-change}| < 2$) tại rễ và/hoặc lá. Bốn gen, bao gồm *Manes.01G114700*, *Manes.01G175800*, *Manes.14G135200* và *Manes.18G048000* có đáp ứng ($|\text{fold-change}| \geq 2$) ở lá hoặc rễ xử lý mặn, trong khi mức độ biểu hiện của *Manes.07G015600* tăng ở cả rễ (4,6 lần) và lá (2,1 lần) trong điều kiện mặn. Gen *Manes.S071500* có đáp ứng giảm ở rễ (-5,0 lần) nhưng tăng ở lá (2,6 lần) trong điều kiện mặn (Hình 1).

Trong điều kiện hạn GSE98537, 6 và 13 (trên tổng số 52) gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có đáp ứng tăng ($\text{fold-change} \geq 2$) và giảm ($\text{fold-change} \leq -2$) ở lá. Đáng chú ý, nghiên cứu đã xác định được 4 (trên tổng số 6) gen được tăng cường biểu hiện rất mạnh tại lá trong xử lý hạn, lần lượt là *Manes.10G129200* (41,4 lần), *Manes.08G056800* (30,8 lần), *Manes.11G124400* (23,3 lần) và *Manes.05G057700* (14,6 lần). Năm (trên tổng số 13) gen có biểu hiện bị giảm rất mạnh tại lá trong xử lý hạn, bao gồm *Manes.S070600* (-82,3 lần), *Manes.15G069100* (-62,3 lần), *Manes.11G044800* (-53,8 lần), *Manes.08G036800* (-21,6 lần), và *Manes.01G175800* (-12,0 lần) (Hình 1).



Hình 1. Biểu hiện của 52 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng trong điều kiện bất lợi

Chú thích: R - Rễ, L - Lá, BL - Lá đỉnh, FEL - Lá trưởng thành, FL - Lá kèm, RT - Rễ, FEC - Mô sẹo phôi hóa.

Trong điều kiện xử lý PEG 6000 GSE93098 (Ding *et al.*, 2017), $^{18}/_{52}$ gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có mức độ phiên mã đáp ứng ($|\text{fold-change}| \geq 2$) ở ít nhất một mẫu mô. Trong đó, *Manes.14G135200* được xác định là gen có biểu hiện được tăng cường mạnh nhất, giá trị fold-change đạt 10,6 lần ở mẫu rễ, và gen *Manes.17G076700* có mức độ phiên mã bị kìm hãm mạnh nhất, giá trị fold-change đạt -29,1 lần ở mẫu lá kèm, đồng thời cũng giảm biểu hiện ở tất cả các vị trí khác, như rễ (-5,8 lần), lá đỉnh (-3,8 lần) và lá trưởng thành (-8,9 lần). Ngoài ra, *Manes.18G048000* là gen được tăng cường biểu hiện ở lá đỉnh (2,8 lần), lá trưởng thành (2,5 lần) và rễ (3,1 lần) nhưng lại giảm biểu hiện ở lá kèm (-2,3 lần) trong điều kiện xử lý PEG 6000 (Hình 1).

Như vậy, kết quả của nghiên cứu này đã xác định được tổng số 28 gen có đáp ứng ở ít nhất một điều kiện xử lý stress phi sinh học (Bảng 1). Trong nghiên

cứu trước đây, dữ liệu biểu hiện của các gen này cũng đã được phân tích tại các cơ quan/bộ phận chính trong cây sắn ở điều kiện thường (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021). Theo đó, *Manes.07G015600* có biểu hiện mạnh ở mẫu mô rễ, thân, lá (gân lá và cuống lá) trong điều kiện thường (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2021), gen này cũng có biểu hiện đáp ứng ở mẫu rễ và lá xử lý mặn và mẫu rễ xử lý PEG 6000 (Bảng 1). Những phân tích này có thể định hướng cho việc nghiên cứu chức năng của gen *Manes.07G015600* nói riêng và 28 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng nói chung liên quan đến quá trình sinh trưởng, phát triển và chống chịu stress phi sinh học ở cây sắn. Trong nghiên cứu này, vùng promoter của 28 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có mức độ biểu hiện đáp ứng với những trạng thái bất lợi khác nhau (Bảng 1) đã tiếp tục được phân tích.

Phân tích dữ liệu GSE89971 (Utsumi *et al.*, 2017), chỉ có 2 gen mã hóa MRP có thay đổi mức

độ phiên mã đáp ứng tại mẫu mô sẹ phôi hóa xử lý thiếu hụt dinh dưỡng, chứng tỏ đa số các MRP chưa rõ chức năng ít bị ảnh hưởng bởi sự tác động của trạng thái thiếu hụt NPK đến cây sắn. Cụ thể,

Manes.18G048000 và *Manes.14G135200* lần lượt có mức độ phiên mã tăng (2,2 lần) và giảm (-7,2 lần) ở mô sẹ phôi hóa.

Bảng 1. Dữ liệu biểu hiện của 28 gen mã hóa MRP có đáp ứng ở ít nhất một điều kiện xử lý stress phi sinh học

TT	Mã định danh gen	Xử lý mặn		Xử lý hạn	Xử lý PEG 6000				Xử lý thiếu hụt NPK
		Rễ	Lá	Lá	Lá đỉnh	Lá trưởng thành	Lá kèm	Rễ	Mô sẹ phôi hóa
1	<i>Manes.01G114700</i>	2,12	0,87	0	0	0	0,97	-5,19	0,81
2	<i>Manes.01G143500</i>	1,59	1,22	3,60	1,62	-5,32	1,50	-2,18	0,83
3	<i>Manes.01G175800</i>	1,05	-2,78	-12,05	-2,79	1,86	0,97	0	1,03
4	<i>Manes.02G073500</i>	1,05	1,02	0	6,45	0	2,76	0,96	1,03
5	<i>Manes.05G006500</i>	1,33	1,41	0	0	0	-6,07	0	0,96
6	<i>Manes.06G134400</i>	0	0	-5,88	0	0	2,08	-4,65	0
7	<i>Manes.07G015600</i>	4,62	2,06	0,79	1,01	1,27	0,82	-2,48	0,88
8	<i>Manes.07G110100</i>	0,78	0,48	-2,93	-2,15	0,51	1,04	0	1,01
9	<i>Manes.08G036800</i>	0,86	0,95	-21,59	0	0	0	1,70	1,85
10	<i>Manes.10G116100</i>	0	0	2,23	0	0	0	0	0
11	<i>Manes.10G129200</i>	1,09	1,01	41,36	1,07	0,63	0,51	-4,95	1,02
12	<i>Manes.11G044800</i>	0	0	-53,83	0	0	0	0	0
13	<i>Manes.11G124400</i>	0,76	0,70	23,35	1,26	0,98	0,66	0,82	0,97
14	<i>Manes.12G009300</i>	0,92	1,16	1,10	2,33	1,87	2,78	1,80	0,85
15	<i>Manes.12G109700</i>	0,90	0,74	0,63	1,69	0,74	3,99	0,50	0,73
16	<i>Manes.14G135200</i>	-3,65	1,10	0	0	0	0	10,56	-7,17
17	<i>Manes.14G100500</i>	1,14	1,13	0	0	0	0,97	3,54	1,15
18	<i>Manes.15G190500</i>	0	0	-2,23	0,75	0	0	-2,54	0
19	<i>Manes.15G069100</i>	1,22	0,74	-62,27	1,17	1,18	3,69	-5,18	1,02
20	<i>Manes.17G076700</i>	1,06	1,02	0,62	-3,84	-8,90	-29,02	-5,84	1,02
21	<i>Manes.18G048000</i>	1,41	-2,53	-9,16	2,83	2,55	-2,29	3,11	2,22
22	<i>Manes.S071500</i>	-4,96	2,56	-4,65	0,69	1,21	1,89	2,43	1,02
23	<i>Manes.02G019700</i>	0	0	-9,17	0	0	0	0	0
24	<i>Manes.05G057700</i>	0,96	0,80	14,65	1,17	1,09	0,62	0,93	1,27
25	<i>Manes.06G040000</i>	0	0	-6,06	0	0	0	0	0
26	<i>Manes.08G056800</i>	0	0	30,75	0	0	0	0	0
27	<i>Manes.18G074300</i>	0	0	-8,15	0	0	0	0	0
28	<i>Manes.S070600</i>	0	0	-82,37	0	0	0	0	0

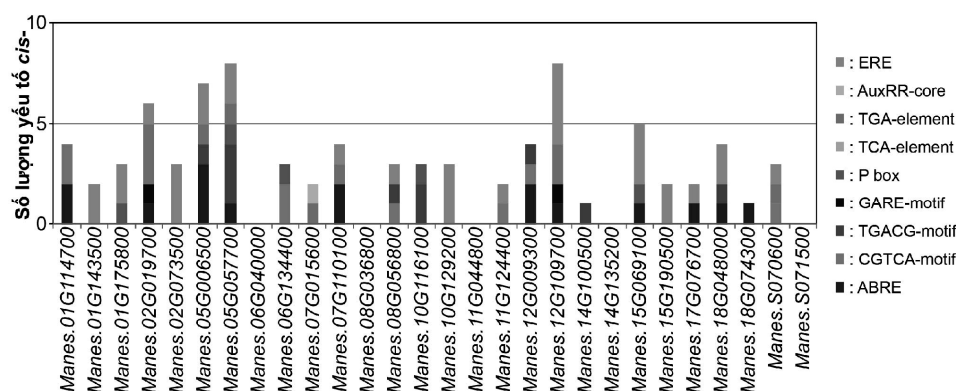
3.2. Phân tích yếu tố điều hòa *cis*- trên vùng promoter của gen mã hóa MRP ở sắn

Để tìm hiểu sự điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến con đường tín hiệu hormone, trình tự 1000 bp nằm trên vùng promoter của 28 gen đáp ứng bất lợi được sử dụng để phân tích yếu

tố điều hòa *cis*- theo nghiên cứu gần đây (Cuong *et al.*, 2018). Theo đó, các nhóm yếu tố điều hòa *cis*- đáp ứng hormone (abscisic acid, jasmonic acid, gibberellin, salicylic acid, auxin, và ethylene) mô tả trong nghiên cứu gần đây (Chu *et al.*, 2018) được tìm kiếm trên vùng promoter bằng công cụ

BioEDIT (Hall, 1999) và PlantCARE. Kết quả đã xác định được tổng số 83 yếu tố điều hòa *cis*- cảm

ứng với hormone, chiếm tỷ lệ 3,6 yếu tố/promoter (Hình 2).



Hình 2. Số lượng yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng hormone trên vùng promoter của các gen mã hóa MRP đáp ứng bất lợi ở sắn

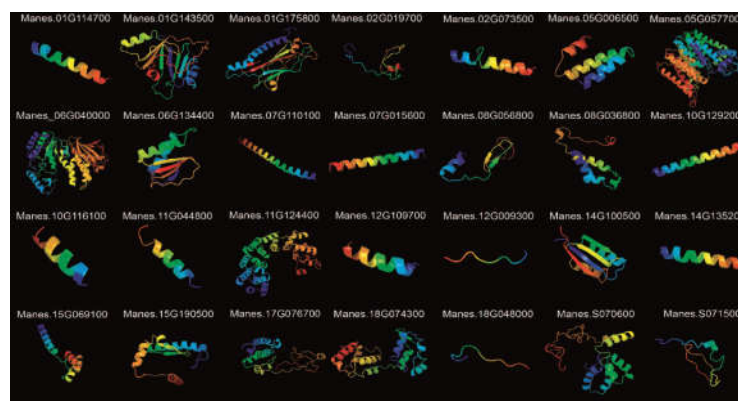
Nghiên cứu cho thấy 11, 11, 7, 7 và 15 (trên tổng số 28) gen có chứa lần lượt các yếu tố ABRE (yếu tố cảm ứng với abscisic acid), yếu tố đáp ứng jasmonic acid, gibberellin, auxin và ethylene. TCA-element là yếu tố đáp ứng với salicylic acid lại không được ghi nhận trên bất kỳ vùng promoter của gen nào. Trong khi đó, yếu tố đáp ứng ethylene được xác định ở 16/28 gen. Tần số xuất hiện yếu tố cảm ứng hormone dao động từ 0,25 (yếu tố cảm ứng gibberellin) - 1,1 yếu tố/gen (yếu tố cảm ứng ethylene) (Hình 2).

Phân tích cho thấy, các vùng promoter của 5 gen, bao gồm *Manes.06G040000*, *Manes.08G036800*, *Manes.11G044800*, *Manes.14G135200* và *Manes.S071500* không chứa các yếu tố điều hòa *cis*- đáp ứng hormone (Hình 2). Đáng chú ý, vùng promoter của 2 gen, *Manes.05G057700* và *Manes.12G109700* có số lượng yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng hormone nhiều nhất (8 yếu tố) (Hình 2). Trong nghiên cứu trước đây, các gen đáp ứng với hạn cũng ghi nhận sự tích lũy của yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng hormone, đặc biệt là ABRE, trên vùng promoter, chứng tỏ sự biểu hiện của gen trong đáp ứng hạn được điều hòa thông qua con đường tín hiệu phụ thuộc vào abscisic acid (Chu *et al.*, 2018). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, trên vùng promoter của 28 gen mã hóa MRP đáp ứng stress phi sinh học ở sắn có tần số xuất hiện nhiều của các trình tự điều hòa phiên mã, đặc biệt là các yếu tố điều hòa liên quan đến chống chịu điều kiện bất lợi. Kết quả gợi ý rằng

28 gen mã hóa MRP có thể tham gia vào quá trình đáp ứng stress phi sinh học, thông qua con đường tín hiệu hormone, điển hình như phụ thuộc vào abscisic acid và ethylene (Chu *et al.*, 2018).

3.3. Xây dựng mô hình cấu trúc không gian của MRP ở sắn

Trong nghiên cứu này, mô hình không gian của 28 MRP đã được tìm hiểu nhằm cung cấp thêm những dẫn liệu về cấu trúc của các phân tử quan tâm. Kết quả cho thấy, các mô hình 3D được xây dựng cho các MRP có độ tin cậy và mức độ bao phủ của mô hình tương đối biến thiên. Cụ thể, độ tin cậy của thuật toán xây dựng mô hình dao động từ 16,7 - 100%, trong đó, $20/28$ cấu trúc có giá trị tin cậy > 50%, ngoại trừ 8 mô hình, tương ứng với 8 MRP, lần lượt là *Manes.18G048000* (16,7%), *Manes.12G009300* (33,7%), *Manes.15G069100* (40,4%), *Manes.02G019700* (40,9%), *Manes.10G116100* (42,7%), *Manes.S071500* (48,2%), *Manes.12G109700* (49,3%) (Bảng 2). Tuy nhiên, mức độ bao phủ của mô hình 3D đối với 28 MRP được ghi nhận ở mức trung bình, đạt từ 3 - 84% (Bảng 2). Điều này được giải thích do đây là MRP chưa được chú giải vùng chức năng, vì vậy, các mô hình 3D đã biết có độ bao phủ không cao khi mô phỏng cấu trúc của 28 phân tử này. Kết quả này cũng được kiểm chứng trong nghiên cứu trước đây về nhóm MRP ở *Arabidopsis* và đậu tương. Theo đó, cấu trúc không gian của các MRP được mô phỏng ở hình 3.



Hình 3. Mô hình cấu trúc không gian của 28 MRP ở sẵn

Tiếp theo, kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy cấu trúc bậc 2 của 28 MRP được tạo nên bởi sự đa dạng của cấu trúc xoắn anpha và nếp gấp beta. Cụ thể, phần lớn các MRP có cấu trúc xoắn alpha (trung bình đạt 55,32%) chiếm nhiều hơn nếp gấp beta (trung bình đạt 8,07%), ngoại trừ Manes.01G175800 (alpha: 16%, beta: 41%),

Manes.01G143500 (alpha: 18%, beta: 31%) và Manes.14G100500 (alpha: 27%, beta: 39%) (Bảng 2). Cấu trúc xoắn alpha chiếm đa số ở các phân tử MRP được giải thích do gốc Met có khả năng tạo xoắn bền vững, trong khi Ser, Ile, Lys, Arg, Thr và Gly là các gốc axit amin tạo xoắn không bền vững.

Bảng 2. Đặc điểm cấu trúc không gian của MRP ở sẵn

Mã định danh	Mô hình	Độ tin cậy (%)	Độ bao phủ (%)	Xoắn alpha (%)	Gấp beta (%)	Đoạn xuyên màng (%)
Manes.01G114700	c3vgxD	78,8	16	69	0	20
Manes.01G143500	d1q0oa2	99,9	79	18	31	-
Manes.01G175800	c1yycA	97,8	54	16	41	10
Manes.02G019700	d1ff3c	40,9	5	33	0	-
Manes.02G073500	c3vgxD	80,6	16	62	0	21
Manes.05G006500	c2lseA	37,5	37	88	0	-
Manes.05G057700	c6snhX	100,0	84	75	1	61
Manes.06G040000	c7o0gA	100,0	41	41	17	-
Manes.06G134400	c6zywI	100,0	53	35	19	-
Manes.07G015600	c4d0gC	60,7	22	88	0	-
Manes.07G110100	c7c7yB	80,3	40	83	0	-
Manes.08G036800	c6m6qA	63,7	56	79	0	13
Manes.08G056800	c2hr5B	65,9	14	48	5	-
Manes.10G116100	c2qdqB	42,7	8	33	19	-
Manes.10G129200	c4d0gC	74,4	23	90	0	-
Manes.11G044800	c6wj2H	87,9	10	61	1	-
Manes.11G124400	c3n7qA	100,0	60	69	1	-
Manes.12G009300	c5hycC	33,7	7	72	0	38
Manes.12G109700	c6gwxA	49,3	3	43	0	-
Manes.14G100500	c7nmmA	99,9	84	27	39	-
Manes.14G135200	c3vgxD	68,3	16	64	0	21
Manes.15G069100	c5kxiC	40,4	50	89	0	37
Manes.15G190500	d1n6ja	100,0	27	37	3	-
Manes.17G076700	c4j80B	100,0	80	42	10	-
Manes.18G048000	d1xn7a	16,7	8	55	6	-
Manes.18G074300	c6taqA	97,3	59	48	7	-
Manes.S070600	c6rwwA	98,3	44	48	2	-
Manes.S071500	c3e6eC	48,2	32	36	24	-

Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng đã xác định được 8 phân tử MRP xuất hiện cấu trúc helix xuyên màng, bao gồm Manes.01G114700 (20%), Manes.01G175800 (10%), Manes.02G073500 (21%), Manes.05G057700 (61%), Manes.08G036800 (13%), Manes.12G009300 (38%), Manes.14G135200 (21%) và Manes.15G069100 (37%) (Bảng 2). Kết quả này chứng tỏ rằng các MRP này đều cư trú trên các màng, có thể đóng vai trò như những kênh vận chuyển, từ đó tham gia vào điều hòa áp suất thẩm thấu khi tế bào chịu tác động của những stress phi sinh học.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được 28 gen mã hóa MRP chưa rõ chức năng có biểu hiện đáp ứng trong ít nhất một điều kiện xử lý bất lợi với giá trị $|\text{fold-change}| \geq 2$. *Manes.18G048000* được xác định là gen đáp ứng trong tất cả các điều kiện bất lợi phi sinh học, trong khi *Manes.10G129200* và *Manes.S070600* là hai gen có đáp ứng tăng (41,3 lần) và giảm mạnh nhất (-82,3 lần) ở lá khi xử lý hạn.

Nghiên cứu đã xác định được 23 gen mã hóa MRP có vùng promoter chứa ít nhất một yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng tín hiệu hormone. *Manes.05G057700* và *Manes.12G109700* là hai gen có vùng promoter được tìm thấy nhiều yếu tố điều hòa *cis*- cảm ứng hormone nhất.

Nghiên cứu đã mô phỏng cấu trúc 3D của 28 phân tử MRP. Trong đó, 25 phân tử MRP có nhiều dạng xoắn α - hơn dạng nếp gấp β -. Kết quả đã dự đoán được 8 phân tử MRP có thể cư trú trên màng do xuất hiện cấu trúc helix xuyên màng.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ tiếp tục nhằm kiểm chứng mức độ biểu hiện của 28 gen mã hóa MRP trong điều kiện stress phi sinh học bằng phương pháp thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chu Đức Hà, La Việt Hồng, Lê Hoàng Thu Phương, Lê Thị Thảo, Hoàng Thị Thao, Phạm Thị Lý Thu, 2018. Nghiên cứu cấu trúc của gen mã hóa Nuclear factor-YB ở sắn liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5 (90): 5-9.

Chu Đức Hà, Nguyễn Hà My, Nguyễn Chí Thanh, Phạm Thị Dung, Nguyễn Quốc Trung, Phạm Phương Thu, Lê Thị Ngọc Quỳnh, Hà Thị Quyển, Lê Thị Hiên, La Việt Hồng, 2021. Phân tích dữ liệu của protein giàu Methionine thông qua sàng lọc hệ protein của sắn. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5(126): 28-33.

Bredeson, J.V., Lyons, J.B., Prochnik, S.E., Wu, G.A., Ha, C.M., Edsinger-Gonzales, E., Grimwood, J., Schmutz, J., Rabbi, I.Y., Egesi, C., Nauluvula, P., Lebot, V., Ndunguru, J., Bart, R.S., Setter, T.L., Gleadow, R.M., Kulakow, P., Ferguson, M.E., Rounsley, S., Rokhsar, D.S., 2016. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. *Nat Biotechnol*, 34 (5): 562-570.

Chu, H.D., Nguyen, K.H., Watanabe, Y., Le, D.T., Pham, L.T., Mochida, K., Tran, L.P., 2018. Identification, structural characterization and gene expression analysis of members of the Nuclear factor-Y family in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dehydration and abscisic acid treatments. *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (11): 3290.

Cuong, D.T., Ha, D.C., Kien, H.N., Yasuko, W., Hong, V.L., Khanh, D.T., Lam Son, P.T., 2018. Genome-wide identification of the TCP transcription factor family in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their transcriptional responses to dehydration and exogenous abscisic acid treatments. *J Plant Growth Reg.* 37: 1286-1299.

Ding, Z., Fu, L., Yan, Y., Tie, W., Xia, Z., Wenquan, W., Ming P., Wei, H., Jiaming Z., 2017. Genome-wide characterization and expression profiling of HD-Zip gene family related to abiotic stress in cassava. *PLoS One*, 12(3): e0173043.

Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., et al., 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, 40 (Database issue): D1178-D1186.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95-98.

Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci.*, 10: 800.

Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., Sternberg, M., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.*, 10 (6): 845-858.

Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2019. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res*, 47 (8): e47-e47.

- Malik, A.I., Kongsil, P., Nguyễn, V.A., Ou, W., Sholihin, Srean, P., Sheela, M.N., Becerra López-Lavalle, L.A., Utsumi, Y., Lu, C., Kittipadukul, P., Nguyễn, H.H., Ceballos, H., Nguyễn, T.H., Selvaraj Gomez, M., Aiemnaka, P., Labarta, R., Chen, S., Amawan, S., Sok, S., Youabee, L., Seki, M., Tokunaga, H., Wang, W., Li, K., Nguyễn, H.A., Nguyễn, V.Đ., Hàm, L.H., Ishitani, M., 2020. Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions. *Breed Sci.*, 70 (2): 18180.
- Onsaya, P., Minoru, U., Misao, I., Yukari, K., Yoshinori, U., Akihiro, M., Maho, T., Chikako, U., Hitoshi S., Minoru, Y., Jarunya, N., Motoaki S., 2017. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid alleviates salinity stress in cassava. *Front Plant Sci*, 7(2039): 1-16.
- Ray, D.K., West, P.C., Clark, M., Gerber, J.S., Prishchepov, A.V., Chatterjee, S., 2019. Climate change has likely already affected global food production. *PloS One*, 14 (5): e0217148.
- Utsumi, Y., Utsumi, C., Tanaka, M., Ha, V.T., Matsui, A., Takahashi, S., Seki, M., 2017. Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and phosphate. *PLoS One*, 12(8): e0180736.

Analysis of abiotic stress responses and 3D models of Methionine-rich proteins in cassava by bioinformatics approach

Nguyen Huu Kien, Ta Thi Dieu Linh, Chu Duc Ha, Nguyen Ha My, La Viet Hong, Le Thi Ngoc Quynh, Nguyen Quynh Anh, Bui Thi Thu Huong, Dong Huy Gioi

Abstract

Plants need optimal environmental conditions to grow and develop, so they are also the group most affected by abiotic stresses, such as heat, cold, salinity, drought and floods. Among them, Met-rich protein (MRP) has been known as one of the major macromolecules that are dramatically affected by abiotic stresses. In this study, 52 genes encoding uncharacterized MRPs in cassava (*Manihot esculenta*) cultivar 'KU50' exhibited different expression patterns in various RNA-Seq datasets, like saline stress, drought, nutrient deficiency, and polyethylene glycol 6000 treatment. The results identified a total of 28 genes encoding MRP of unknown function but responsive expression under at least one stress condition ($|\text{fold-change}| \geq 2$). Interestingly, *Manes.18G048000* was noted as an abiotic-stresses-responsive gene, while *Manes.10G129200* and *Manes.S070600* were strongly induced (by 41.3-fold) and reduced (by -82.3-fold) in leaf tissues under drought conditions. The analysis revealed that various hormone-related cis-regulatory elements, like abscisic acid-, jasmonic acid- and ethylene-responsive elements, were highly accumulated in the promoter regions of 28 stress-responsive genes. The 3D modeling showed that MRPs are mostly constructed by the α -helix and the β -pleated sheet. Taken together, our study could provide a comprehensive foundation for further functional characterization of stress-responsive genes.

Keywords: Methionine-rich protein, cassava, expression profiles, abiotic stress, bioinformatics

Ngày nhận bài: 04/8/2021
Ngày phản biện: 15/10/2021

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Đức Bách
Ngày duyệt đăng: 24/12/2021

ỨNG DỤNG TỪ TRƯỜNG TRONG THỨC ĐẨY SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ SINH KHỐI CỦA CÂY TRỒNG

Nguyễn Hữu Kiên¹, Chu Đức Hà^{2,*}, La Việt Hồng³, Hà Thị Quyển²,
Nguyễn Lê Khanh², Phạm Châu Thùy², Trần Đăng Khoa²,
Nguyễn Đăng Cơ², Bùi Đình Tú², Lê Huy Hàm^{1,2}

TÓM TẮT

Thực vật luôn tồn tại và sinh sôi trong điều kiện từ trường (magnetic field, MF) trái đất. Tuy nhiên, cơ chế tác động của từ trường đến thực vật đến nay vẫn chưa được làm sáng tỏ. Bài báo trình bày một cách chi tiết về tác động của từ trường đến sinh trưởng, phát triển và sinh khối của cây trồng. Trong đó, xử lý MF được chứng minh có thể tăng cường hoạt tính của các enzyme phân giải giúp tăng tỷ lệ nảy mầm ở hạt. Xử lý MF cũng giúp kích thích tổng hợp sắc tố ở lá, tăng hiệu quả của quang hợp và hô hấp giúp cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn, đồng thời cải thiện được khả năng chống chịu các điều kiện ngoại cảnh bất thuận. Mặc dù vậy, xử lý MF vẫn đặt ra một số câu hỏi liên quan đến độc tính và những tác động môi trường. Tóm lại, bài báo này đã cung cấp một cái nhìn toàn diện về một giải pháp mới trong nghiên cứu sản xuất nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: Từ trường, cây trồng, sinh trưởng, phát triển, bất lợi, tác động

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sinh trưởng và phát triển của thực vật luôn chịu sự tác động nhất định của từ trường (magnetic field, MF) trái đất. Đây được xem là yếu tố cơ bản để thực vật tồn tại thông qua quá trình quang hợp được thực hiện nhờ phát tán bức xạ điện từ và trao đổi chất nội bào nhờ sự thay đổi điện thế màng. Cơ chế ảnh hưởng của MF đến các loài thực vật, nấm và vi khuẩn đã được làm sáng tỏ một phần thông qua mô hình cộng hưởng ion - cyclotron (ion-cyclotron resonance) và mô hình cặp gốc (radical-pair) (Radhakrishnan, 2019). Cho đến nay, MF đã được tìm hiểu và bắt đầu thử nghiệm trong các lĩnh vực sinh học, đặc biệt là liên quan đến khoa học nông nghiệp.

Cụ thể, nỗ lực của các nhà khoa học đã được ghi nhận trong việc chứng minh ảnh hưởng của MF đến sự nảy mầm của hạt, thay đổi hàm lượng hóa chất, từ đó kích thích tăng trưởng và năng suất của cây trồng (Maffei, 2014). Ví dụ, ở mức cường độ MF thích hợp có thể làm tăng tỷ lệ nảy mầm của một số loại hạt nông sản và thúc đẩy quá trình sinh trưởng của cây non (da Silva and Dobránszki, 2016; De Souza *et al.*, 2006). Tuy nhiên, những hiểu biết sâu sắc về ảnh hưởng của MF đến sinh trưởng và phát triển của các loại cây trồng vẫn còn rất hạn chế.

Để định hướng nghiên cứu nông nghiệp áp dụng kỹ thuật liên ngành trong tương lai, bài báo đã tóm lược một cách toàn vẹn những thành công trong việc sử dụng MF để kích thích quá trình sinh trưởng và phát triển một số loại cây trồng ở các giai đoạn khác nhau. Đồng thời đưa ra một số đề xuất nhằm định hướng ứng dụng MF vào công nghệ tế bào thực vật ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Một số tài liệu khoa học liên quan đến MF, công nghệ sinh học thực vật và khoa học nông nghiệp đã được khai thác và tóm lược trong nghiên cứu này.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tham khảo tài liệu từ đề tài, dự án của các đơn vị nghiên cứu, công ty, trường đại học, trên Internet, bài báo, thông tin từ hội nghị, hội thảo trong nước và quốc tế. Điều tra, khảo sát thông tin từ nhà quản lý, nhà nghiên cứu, doanh nghiệp, công ty theo mẫu phiếu chuẩn bị sẵn, phương pháp chuyên gia và tự nghiên cứu. Tham khảo đường lối, chính sách của Đảng, Nhà nước, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

² Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

³ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

* Tác giả chính: E-mail: hachu_amser@yahoo.com