

## NGHIÊN CỨU TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA CHO LEA PROTEIN Ở MỘT SỐ GIỐNG LÚA ĐỊA PHƯƠNG CHỊU MẶN

Trần Xuân An<sup>1</sup>, Đặng Xuân Nghiêm<sup>2</sup>, Tăng Thị Hạnh<sup>3</sup>, Phạm Văn Cường<sup>3</sup>, Đỗ Thị Phúc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email\*: dothiphuc13380@gmail.com

Ngày gửi bài: 13.05.2014

Ngày chấp nhận: 15.07.2014

### TÓM TẮT

LEA protein là một họ bao gồm nhiều loại protein được tích lũy lượng lớn ở giai đoạn phát triển muộn của phôi hạt. LEA protein được chứng minh có vai trò trong khả năng chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi ở thực vật như chịu hạn, chịu mặn. Gen mã hóa cho LEA protein được chia thành 6 nhóm khác nhau. Gen mã hóa cho Lea21 thuộc nhóm 5 trong họ gen Lea. Đến nay, chưa có nghiên cứu nào về trình tự gen Lea21 ở giống lúa Việt Nam. Do đó, nhằm mục đích nghiên cứu sự đa dạng di truyền ở lúa, gen lea 21 được nhân bản và giải trình tự ở một số giống lúa địa phương có khả năng chịu mặn. Toàn bộ đoạn gen mã hóa cho Lea21 với 2 exon và 1 intron đã được nhân bản thành công bằng kỹ thuật PCR, sau đó được giải trình tự tự động và kết quả trình tự nucleotide được phân tích, so sánh. Kết quả cho thấy đoạn gen mã hóa cho Lea21 rất bảo thủ, không có sự sai khác nào trong trình tự nucleotide được phát hiện ở các giống lúa nghiên cứu.

Từ khóa: Chịu mặn, LEA protein, Lea21, lúa, tính chống chịu.

### Study on Sequences of Gene Encoding Lea Protein in Some Salt Resistant Rice Varieties

#### ABSTRACT

LEA protein comprises a large group of proteins which highly accumulates in plant seeds at late stage of maturation. LEA protein is proven to be involved in abiotic stress responses in plants, such as under dehydration and salinity. Genes encoding LEA proteins are divided into 6 different groups. Lea21 gene belongs to group 5. Up to now, there is no report about sequence polymorphism of Lea21 gene in Vietnamese rice varieties. Therefore, in order to investigate the genetic diversity in rice, Lea21 gene from some salt resistant rice varieties was amplified and sequenced. The Lea21 gene, which consists of 2 exon and 1 intron, was successfully amplified using PCR technique and was sequenced. It was shown that no difference in nucleotide sequences among investigated rice varieties was observed, indicating that the sequence of Lea21 gene is highly conserved.

Keywords: Abiotic stress tolerance, LEA protein, Lea21, rice, salinity resistance

#### 1. DẶT VẤN ĐỀ

LEA protein (late embryogenesis abundant) là một họ protein lớn, được phát hiện lần đầu tiên ở hạt cây bông trong giai đoạn phát triển muộn của phôi (Dure et al., 1981). LEA protein được tích lũy nhiều trong hạt, tuy nhiên LEA protein cũng được tìm thấy ở một số cơ quan khác ở thực vật

trong điều kiện môi trường bất lợi (Tunnacliffe and Wise, 2007) và ở một số loài vi khuẩn (Battista et al., 2001), giun tròn (Browne et al., 2002), côn trùng (Kikawada et al., 2006), vi khuẩn lam (Close and Lammers, 1993).

Ở thực vật, LEA protein có vai trò trong tính chống chịu của cây trồng với một số điều kiện môi trường bất lợi. Mối liên quan giữa LEA

protein với khả năng chống chịu được phát hiện ở nhiều đối tượng thực vật khác nhau như cây cà chua, lúa mì, lúa mạch, *Arabidopsis*, lúa (Ingram and Bartels, 1996; Tunnacliffe and Wise, 2007; Olvera-Carrillo et al., 2010; Sasaki et al., 2014). Gen mã hóa cho LEA protein được chuyển vào thực vật giúp tăng cường khả năng chống chịu của cây chuyển gen. Gen HVA1 của lúa mạch được chuyển vào cây lúa và cây lúa mì làm tăng khả năng chịu hạn ở cây lúa và cây lúa mì chuyển gen (Sivamani et al., 2000; Xu et al., 1996). Cây thuốc lá và cây *Arabidopsis* chuyển gen có khả năng chịu lạnh cao hơn (Hara et al., 2003; Ndong et al., 2002); cây lúa chuyển gen được tăng sức chống chịu với điều kiện hạn và mặn (Hu, 2008; Duan and Cai, 2012).

Mặc dù chưa có nhiều công trình nghiên cứu chi tiết về cơ chế bảo vệ của LEA protein nhằm giúp tế bào, cơ thể chống chịu lại điều kiện ngoại cảnh bất lợi, tuy nhiên đã có một số nghiên cứu cho thấy LEA protein có thể liên kết với một số ion thông qua con đường phosphoryl hóa (Alsheikh et al., 2003, Alsheikh et al., 2005; Krueger et al., 2002), LEA protein có chức năng dọn dẹp các gốc tự do (Hana et al., 2003).

Họ LEA protein là một họ lớn, được chia thành nhiều nhóm khác nhau tùy theo Pfam domain của trình tự axit amin (Hundertmark and Hincha, 2008). Ở lúa, bằng công cụ tin sinh, Wang et al. đã phát hiện ra 34 gen mã hóa cho các protein thuộc họ LEA protein và được chia thành 6 nhóm khác nhau bao gồm LEA\_1, LEA\_2, LEA\_3, LEA\_4, dehydrin và SMP (Wang et al., 2007).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu trình tự đoạn gen *OsLea21* thuộc nhóm LEA\_5 ở một số giống lúa địa phương có khả năng chịu mặn nhằm xem xét sự đa hình của đoạn gen *OsLea21* ở lúa.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Các mẫu giống lúa được sử dụng bao gồm 4 giống lúa địa phương thu thập từ vùng ven biển phía Bắc Việt Nam: Cườm, Lúa Châm biển.

Chiêm rong, Hơm râu và một giống đôi chứng-mần cảm mặn Nipponbare. Các giống lúa được cung cấp bởi Trung tâm tài nguyên thực vật.

### 2.2. Đánh giá khả năng chịu mặn của các giống lúa

Các giống lúa được trồng trong dung dịch dinh dưỡng Kimura (Nakamura et al., 2002) trong điều kiện nhà lưới tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Khi cây được 2 tuần tuổi thì tiến hành xử lý mặn với dung dịch NaCl có nồng độ 113 mM trong 2 tuần. Sau 5 và 10 ngày, tiến hành đếm tỷ lệ cây sống sót. Tỷ lệ này tính bằng số cây có 3 lá xanh/nhánh trên tổng số cây theo dõi. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

### 2.3. Tách chiết ADN tổng số

Mẫu lá lúa non được thu và nghiền nhỏ sử dụng máy nghiền mẫu Mixer mill (Retsch, CHLB Đức). ADN tổng số từ lá lúa non được tách chiết theo phương pháp sử dụng CTAB (Doyle and Doyle, 1990). ADN sau khi tách chiết được kiểm tra nồng độ và chất lượng bằng cách điện di trên gel agarose 1% và đo OD bằng máy Nanodrop Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Mỹ).

### 2.4. Phương pháp PCR

Gen *OsLea21* của lúa được nhân bản từ ADN tổng số bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu sau đây:

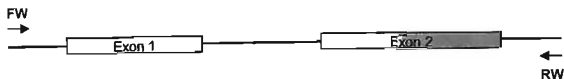
Lea21-FW:5'-TCGCCGCTATAAGAAGGAC-3'

Lea21-RW:5'-CCTAAATGCGTGCATCCGTC-3'

Phản ứng PCR được tiến hành với thể tích 25 $\mu$ l gồm các thành phần sau: ADN tổng số (20 ng); mỗi tổng số (0.4  $\mu$ M); dNTPs (0.2 mM); Mg<sup>2+</sup> (1.5mM); Taq DNA polymerase (1U); đệm 1X. Chu trình nhiệt của phản ứng được sử dụng là 95°C: 5 phút, 35 chu kì gồm ba bước 95°C: 30 giây, 56°C: 30 giây, 72°C: 1 phút; sau đó 72°C: 7 phút và kết thúc ở 4°C trên máy PCR Kyratek.

### 2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự ADN

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, băng sản phẩm PCR được cắt từ



bản gel và tinh sạch sử dụng kit thỏi gel GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st base, Singapo sử dụng máy giải trình tự ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

## 2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Trình tự gen *OsLea21* được tìm trên cơ sở dữ liệu của lúa (The MSU Rice Genome Annotation Project Database) (Kawahara et al., 2013). Cặp mỗi đặc hiệu dùng cho phản ứng PCR để nhân bản gen được thiết kế sử dụng phần mềm Primer-Blast trên NCBI. Kết quả giải trình tự được phân tích sử dụng phần mềm Chromas. Các trình tự nucleotide được so sánh sử dụng công cụ Multiple sequence alignment.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khả năng chịu mặn khác nhau của các giống lúa

Để đánh giá mức độ chịu mặn ở các giống lúa, sau 2 tuần trồng trong dung dịch dinh dưỡng bình thường, cây lúa được chuyển sang dung dịch dinh dưỡng chứa NaCl với nồng độ 113mM. Sau khi tiến hành xử lý mặn với nồng độ NaCl cao trong 5 ngày và 10 ngày, tỷ lệ sống sót của các giống lúa là khác nhau, thể hiện trong bảng 1.

Sau xử lý mặn 5 ngày, tỷ lệ cây sống sót ở các giống lúa biến động từ 86,1-100%; sau 10 ngày tỷ lệ dao động từ 0-100%. Nipponbare là giống lúa mẫn cảm với điều kiện mặn, do đó sau 10 ngày xử lý mặn, giống lúa này không có khả năng sống sót. Kết quả ở bảng 1 cho thấy giống Cườm là giống kháng mặn cao (100%), tiếp theo là giống Lúa chàm biển (97,2%), giống Chiêm rong (88,9%), giống Hom râu có khả năng kháng trên trung bình (63,9%). Như vậy, các giống lúa được sử dụng trong nghiên cứu có khả năng kháng mặn khác nhau.

### 3.2. Nhân bản gen *OsLea21*

Nhằm đánh giá sự đa hình của gen *OsLea21* ở các giống lúa nghiên cứu, chúng tôi tiến hành nhân bản, giải trình tự gen *OsLea21* ở các giống lúa và so sánh kết quả.

Lá non của các giống lúa được sử dụng để tách chiết ADN tổng số. Sau đó, ADN tổng số được làm khuôn cho phản ứng PCR để nhân gen *OsLea21* với cặp mỗi đặc hiệu. Kết quả chạy điện di cho thấy sản phẩm PCR được nhân lên thành công với kích thước đúng với kích thước mong muốn (678bp) (Hình 1). Băng ADN sản phẩm PCR được cất khỏi bản gel và tinh sạch. Sau đó, sản phẩm PCR tinh sạch được đọc trình tự ADN.

**Bảng 1.** Tỷ lệ cây mạ sống sót của các giống sau thời gian xử lý mặn 5 ngày và 10 ngày (%)

| TT | Tên giống                       | Sau xử lý mặn 5 ngày | Sau xử lý mặn 10 ngày |
|----|---------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1  | Hom râu                         | 91,7                 | 63,9                  |
| 2  | Cườm                            | 100                  | 100                   |
| 3  | Chiêm rong                      | 100                  | 88,9                  |
| 4  | Lúa Chàm biển                   | 97,2                 | 97,2                  |
| 5  | Nipponbare (đối chứng -mẫn cảm) | 86,1                 | 0                     |

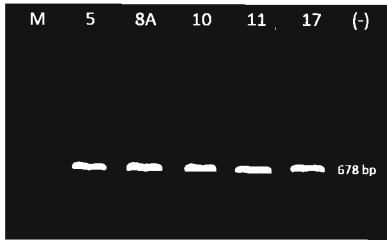
### 3.4. So sánh các trình tự của gen *OsLea21* ở các giống lúa

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự thành công. Hình 2 cho thấy một phần kết quả giải trình tự của gen *OsLea21* ở giống Cượ̀m.

Kết quả so sánh các trình tự gen *OsLea21* của các giống lúa nghiên cứu với nhau và với trình tự trên cơ sở dữ liệu của lúa Rice Genome Annotation Project (Kawahara et al, 2013) cho thấy độ tương đồng rất cao (100%) ở cả vùng exon và intron (Hình 3).

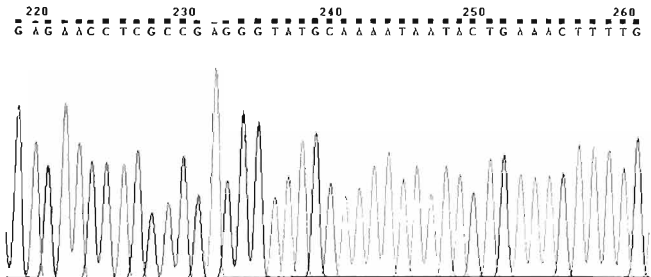
Vùng mã hóa của gen *OsLea21* có chiều dài 395bp bao gồm 2 exon (exon 1: 125bp, exon 2: 163bp) và 1 intron (107bp) mã hóa cho

protein với 96 axit amin. Như vậy, mặc dù các giống lúa có khả năng kháng mặn khác nhau nhưng trình tự gen *OsLea21* là hoàn toàn giống nhau. Điều này có thể là do gen *OsLea21* rất bảo thủ ở lúa. Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu so sánh trình tự gen *OsLea21* ở các giống lúa bản địa có khả năng chống chịu khác nhau. Mặt khác, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng trực tiếp sản phẩm PCR tinh sạch để giải trình tự gen. Đây là cách tiếp cận khác với phương pháp nhân dòng gen (tạo vector tái tổ hợp, biến nạp vào vi khuẩn *E.coli*, tách plasmid và giải trình tự gen), với cách tiếp cận này sai sót trong trình tự nucleotide sẽ được hạn chế tối đa.

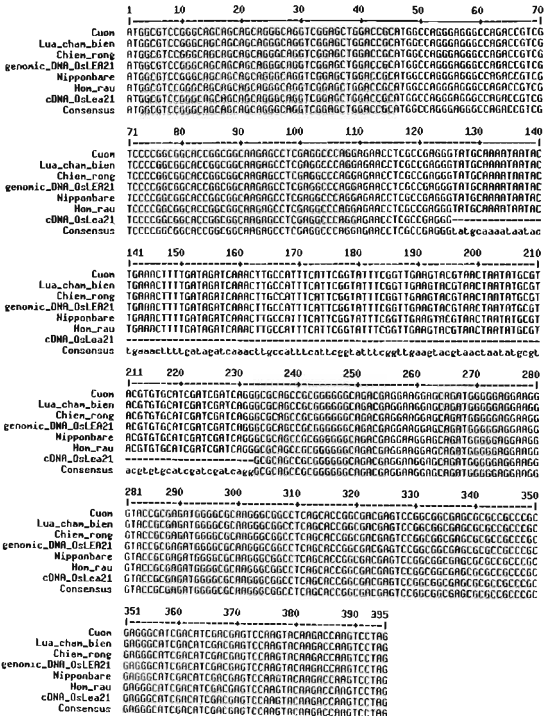


Hình 1. Sản phẩm PCR nhân gen *OsLea21* từ các giống lúa

Ghi chú: M: Marker 1kb, (-): đối chứng âm, 1. Nipponbare, 2. Cượ̀m, 3. Lúa Châm biển, 4. Chôm rông, 5. Hơm rầu.



Hình 2. Một phần kết quả giải trình tự gen *OsLea21* ở giống Cượ̀m



Hình 3. So sánh trình tự nucleotide ở các giống lúa nghiên cứu với trình tự gen *OsLea21* trên cơ sở dữ liệu. Màu đỏ là vùng exon, màu xanh là vùng intron của gen

#### 4. KẾT LUẬN

Các giống lúa giống nghiên cứu có khả năng kháng mặn khác nhau, trong đó Cườm là giống kháng mặn rất cao, Lúa chiêm biển và Chiêm rong kháng mặn cao và Hom râu kháng mặn trên trung bình.

Trình tự nucleotide của gen *OsLea21* có độ tương đồng rất cao ở các giống lúa có độ chống

chịu khác nhau, điều này có thể cho thấy gen *OsLea21* rất bảo thủ ở lúa.

#### LỜI CẢM ƠN

Công trình này được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài cấp trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội năm 2013 mã số TN-13-20 do TS. Đỗ Thị Phúc làm chủ nhiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alsheikh MK, BJ Heyen, SK Randall (2003). Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 40882-40889.
- Alsheikh MK, JT Svensson, SK Randall (2005). Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ.* 2005, 28:1114-1122.
- Battista JR, M-J Park, AE McLemore (2001). Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation, *Cryobiology* 43: 133-139.
- Browne J, A Tunnacliffe, A Burnell (2002). Plant desiccation gene found in a nematode, *Nature* 416: 38.
- Doyle J J and J L Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Duan J, Cai W (2012). OsLEA3-2, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. *PLoS ONE* 7(9): e45117. doi:10.1371/journal.pone.0045117.
- Dure L, SC Greenway, GA Galau (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20. 4162-4168.
- Close TJ, PJ Lammers (1993). An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins, *Plant Physiol.* 101: 773-779.
- Hara M, S Terashima, T Fukaya, TKuboi (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217: 290-298.
- Hu TZ (2008). OsLEA3, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 530-537.
- Hundertmark M, DK Hincha (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Genomics* 9: 118.
- Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton J P, Kanamori H, McCombie W R, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S, Childs KL, Davidson RM, Lin H, Quesada-Ocampo L, Vaillancourt B, Sakai H, Lee SS, Kim J, Numa H, Itoh T, Buell CR, Matsumoto T (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6:4.
- Kikawada T, Y Nakahara, Y Kanamori, K Iwata, M Watanabe, B McGee, A Tunnacliffe, T Okuda (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 348: 56-61.
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R (2002). A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 277: 25062-25069.
- Ingram J, D Bartels (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Nakamura I, S Murayama, Tobita S, Bong BB, Yanagihara S, Ishimine Y and Y Kawamitsu (2002). Effect of NaCl on the photosynthesis, water relations and free proline accumulation in the wild *Oryza* species. *Plant Pro Sci.*: 305-310.
- NDong C, J Danyluk, KE Wilson, Pockock T, NPA Huner, F Sarhan (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analysis. *Plant Physiol* 129: 1368-1381
- Olvera-Carrillo Y, F Campos, JL Reyes, A Garcarrubio, AA Covarrubias (2010). Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in *Arabidopsis* *Plant Physiol* 154: 373-390.
- Sasaki K., N Christov, S Tsuda., R Imai (2014). Identification of a novel LEA protein involved in freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol* 55: 136-47.
- Sivamani E, A Bahieldin, JM Wraith, TAI-Niemi, WE Dyer, T-HD Ho, R Qu (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* 155: 1-9
- Tunnacliffe A, MJ Wise (2007). The continuing conundrum of LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94: 791-812.
- Xu D, X Duan, B Wang, B Hong, T-HD Ho, R Wu (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110: 249-257
- Wang XS, HB Zhu, GL Jn, HL Liu, WR Wu, J Zhu (2007) Genome-scale identification of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 172: 414-420