

# NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC CỦA GEN MÃ HÓA NUCLEAR FACTOR-YB Ở SẮN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN BẤT LỢI

Chu Đức Hà<sup>1</sup>, La Việt Hồng<sup>2</sup>, Lê Hoàng Thu Phương<sup>1,3</sup>,  
Lê Thị Thảo<sup>1,4,5</sup>, Hoàng Thị Thao<sup>3</sup>, Phạm Thị Lý Thu<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Nuclear factor-YB là một trong ba tiểu phần cơ bản của nhân tố phiên mã Nuclear factor-Y, đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học diễn ra trong tế bào thực vật. Trong nghiên cứu này, một số yếu tố điều hòa *cis*-đáp ứng hóc môn và đáp ứng bất lợi đã được tìm thấy trên vùng promoter của 17 gen *MeNF-YB*. Trong đó, vùng promoter của gen *MeNF-YB12* và *-YB14* đều chứa các yếu tố đáp ứng bất lợi. Xây dựng cây phân loại đã chỉ ra rằng *MeNF-YB12*, *-YB14* và *-YB16* nằm trên cùng nhánh với các NF-YB ở đậu tương và *Arabidopsis thaliana* được nghiên cứu trước đây, gợi ý 3 thành viên này có thể đáp ứng với điều kiện hạn. Dữ liệu microarray đã chỉ ra các gen có biểu hiện ở 7 bộ phận chính trên cây sắn trong điều kiện thường. Gen *MeNF-YB2* và *-YB12* được xác định có biểu hiện đặc thù lần lượt ở thân, củ và củ, chồi bên. Mặt khác, *MeNF-YB5* và *-YB14* cũng có biểu hiện mạnh ở củ. Những dữ liệu này gợi ý rằng 2 gen *MeNF-YB14* và *-YB12* có thể đáp ứng với điều kiện hạn.

**Từ khóa:** Nuclear factor-YB, sắn, điều kiện bất lợi, promoter, mức độ biểu hiện

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuclear factor-Y (NF-Y), là một trong những nhân tố phiên mã phổ biến nhất trong hệ gen của hầu hết sinh vật nhân chuẩn trong sinh giới (Zanetti *et al.*, 2017). Là yếu tố bám -CCAAT-, NF-Y được cấu thành từ 3 tiểu phần, NF-YA, NF-YB và NF-YC (Laloum *et al.*, 2013). Nghiên cứu gần đây đã chứng minh vai trò của NF-Y trong điều hòa sự biểu hiện của gen liên quan đến một số quá trình sinh lý diễn ra trong tế bào thực vật (Laloum *et al.*, 2013, Zanetti *et al.*, 2017). Hơn nữa, NF-Y cũng được xác định có tham gia vào cơ chế đáp ứng điều kiện ngoại cảnh bất lợi (Zanetti *et al.*, 2017), như ở đậu tương (Quach *et al.*, 2015) và *Arabidopsis thaliana* (Nelson *et al.*, 2007).

Gần đây, 17 gen mã hóa cho tiểu phần NF-YB ở sắn đã được xác định và phân tích (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017). Trong đó, một số gen *MeNF-YB* đã được xác định có biểu hiện tăng ở mô phân sinh đỉnh chồi, đỉnh rễ, mô sẹo phôi hóa và tổ chức phát sinh phôi cấu tạo soma trong điều kiện thường (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017). Tuy nhiên, các gen này có liên quan như thế nào đến cơ chế đáp ứng và chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi ở cây sắn đến nay vẫn chưa rõ. Trong nghiên cứu này, một số yếu tố điều hòa *cis*- (*cis*- regulatory element, CRE) đáp ứng bất lợi và đáp ứng tín hiệu điều hòa hóc môn đã được phân tích trên vùng promoter của các gen mã hóa tiểu phần NF-YB ở sắn. Sau đó, cây phân loại giữa họ

NF-YB ở sắn và một số NF-YB có đáp ứng hạn được xác định trên cây trồng khác đã được phân tích. Cuối cùng, biểu hiện của các gen mã hóa NF-YB ở sắn được phân tích trên cơ sở dữ liệu microarray.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hệ gen và hệ protein của giống sắn mô hình AM560-2 trên cơ sở dữ liệu Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Trình tự nucleotit và axit amin của tiểu phần NF-YB ở sắn được thu thập trong nghiên cứu trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tìm kiếm yếu tố điều hòa: Vùng trình tự 1000 nucleotit (bắt đầu từ mã mở đầu -ATG-) của mỗi gen mã hóa NF-YB ở sắn được xác định dựa vào mã định danh gen đã được mô tả trước đây (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017) trên công thông tin Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Các CRE đáp ứng hóc môn và đáp ứng bất lợi trên vùng promoter của mỗi gen được phân tích bằng PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002).

- Phương pháp xây dựng cây phân loại: Trình tự axit amin của một số NF-YB đáp ứng với hạn trên đậu tương (Quach *et al.*, 2015) và *A. thaliana* (Nelson *et al.*, 2007) được sử dụng để xây dựng cây phân loại với tiểu phần NF-YB ở sắn (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017) với phương pháp Neighbor-Joining bằng công cụ MEGA (Kumar *et al.*, 2016).

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup> Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Đại học Sư phạm Hà Nội 2

<sup>3</sup> Khoa Nông học, Đại học Nông - Lâm Bắc Giang

<sup>4</sup> Khoa Sinh, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

<sup>5</sup> Công ty CP Bóng đèn phích nước Rạng Đông

- Phương pháp phân tích dữ liệu biểu hiện microarray: Mã định danh của từng gen mã hóa NF-YB ở sắn được sử dụng để truy cập vào dữ liệu microarray trong điều kiện thường (Wilson *et al.*, 2017). Trong đó, thông tin biểu hiện của các gen được phân tích trên 7 bộ phận, bao gồm mô củ, rễ sợi, thân, chồi bên, lá, gân lá và cuống lá (Wilson *et al.*, 2017). Mức độ biểu hiện của các gen được mô hình hóa bằng bản đồ nhiệt trên công cụ Microsoft Excel.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân tích yếu tố điều hòa cis- trên vùng promoter của các gen mã hóa tiểu phần NF-YB ở sắn

Tìm kiếm sự có mặt của CRE có thể cho phép dự đoán chức năng gen mục tiêu. Trong nghiên cứu

này, một số CRE đáp ứng hóc môn, bao gồm yếu tố đáp ứng axit abscisic (abscisic acid responsive element, ABRE), trình tự -CGTCA- và -TGACG- đáp ứng axit jasmonic, yếu tố đáp ứng êtilen, trình tự đáp ứng gibberellin, hộp P và yếu tố -TGA- đáp ứng auxin, đã được tìm thấy trên vùng promoter của hầu hết các gen mã hóa NF-YB ở sắn. Hai gen, *MeNF-YB2* và *-YB15* không chứa bất kỳ CRE đáp ứng hóc môn nào. Số lượng CRE đáp ứng hóc môn phân bố khá dày đặc trên vùng promoter của họ gen mã hóa NF-YB (~1,47 CRE/gen) cho thấy *MeNF-YB* có thể tham gia vào con đường tín hiệu thông qua các hóc môn này. Điều này rất có ý nghĩa vì các gen liên quan đến tính chống chịu điều kiện bất lợi ở thực vật luôn nằm trong mạng lưới dẫn truyền tín hiệu được điều hòa bởi hệ thống hóc môn.

**Bảng 1.** Phân tích vùng promoter của các gen mã hóa tiểu phần NF-YB ở sắn

Tên gen	CRE đáp ứng hóc môn					CRE đáp ứng bất lợi		
	ABA	JA	Gb	Et	Au	[TC] <sub>n</sub>	T <sup>o</sup>	[H <sub>2</sub> O]
<i>MeNF-YB1</i>								
<i>MeNF-YB2</i>								
<i>MeNF-YB3</i>								
<i>MeNF-YB4</i>								
<i>MeNF-YB5</i>								
<i>MeNF-YB6</i>								
<i>MeNF-YB7</i>								
<i>MeNF-YB8</i>								
<i>MeNF-YB9</i>								
<i>MeNF-YB10</i>								
<i>MeNF-YB11</i>								
<i>MeNF-YB12</i>								
<i>MeNF-YB13</i>								
<i>MeNF-YB14</i>								
<i>MeNF-YB15</i>								
<i>MeNF-YB16</i>								
<i>MeNF-YB17</i>								

Ghi chú: CRE: Yếu tố điều hòa cis-; ABA: Axit abscisic; JA: Axit jasmonic; Gb: Gibberellin; Et: Êtilen; Au: Auxin; [TC]<sub>n</sub>: Trình tự lặp giàu -TC-; T<sup>o</sup>: Nhiệt độ; [H<sub>2</sub>O]: Hạn.

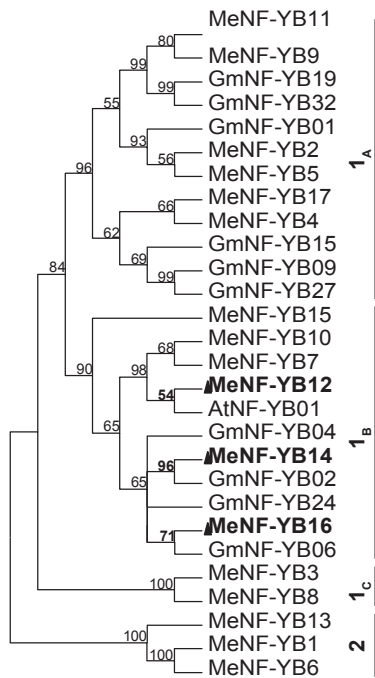
Tương tự, CRE đáp ứng bất lợi cũng được tìm kiếm trên vùng promoter của các gen *MeNF-YB* ở sắn. Tìm kiếm bằng công cụ PlantCARE, 4 nhóm CRE, yếu tố đáp ứng nhiệt độ cao, yếu tố đáp ứng điều kiện lạnh, trình tự bám của MYB đáp ứng với hạn và trình tự lặp giàu -TC- liên quan đến khả năng phòng thủ đã được tiến hành khảo sát (Bảng 1). Promoter của tất cả các gen mã hóa NF-YB ở sắn

đều chứa ít nhất 1 CRE đáp ứng bất lợi, mật độ của nhóm CRE này đạt xấp xỉ 1,23 CRE/gen. Đáng chú ý, vùng promoter của *MeNF-YB12* và *-YB14* đều chứa tất cả các CRE đáp ứng hạn, nhiệt độ (Bảng 1). Gần đây, tần suất phân bố của CRE đáp ứng bất lợi trên vùng promoter của nhóm gen mã hóa protein giàu methionin ở *A. thaliana* đã được ghi nhận đạt khoảng 0,54 CRE/gen (Chu *et al.*, 2016). Những kết

quả này đã cho thấy sự quy tụ một cách dày đặc CRE đáp ứng học môn và đáp ứng bất lợi trên promoter chứng tỏ họ gen *MeNF-YB* đóng vai trò quan trọng trong chống chịu điều kiện bất lợi, tương tự như những ghi nhận trước đây trên các đối tượng cây trồng khác (Zanetti *et al.*, 2017).

**3.2. Kết quả xây dựng cây phân loại của NF-YB liên quan đến tính chống chịu hạn**

Xây dựng cây phân loại có thể cho phép dự đoán chức năng của tiểu phân NF-YB ở sắn dựa vào những protein đã biết vai trò trên đậu tương (Quach *et al.*, 2015) và *A. thaliana* (Nelson *et al.*, 2007). Những thành viên của họ NF-YB ở sắn nếu được xác định nằm cùng nhánh với NF-YB ở đậu tương và/hoặc *A. thaliana* với giá trị cut-off lớn hơn 50%. Kết quả phân tích cây phân loại bằng công cụ MEGA (Kumar *et al.*, 2016) được thể hiện ở hình 1.

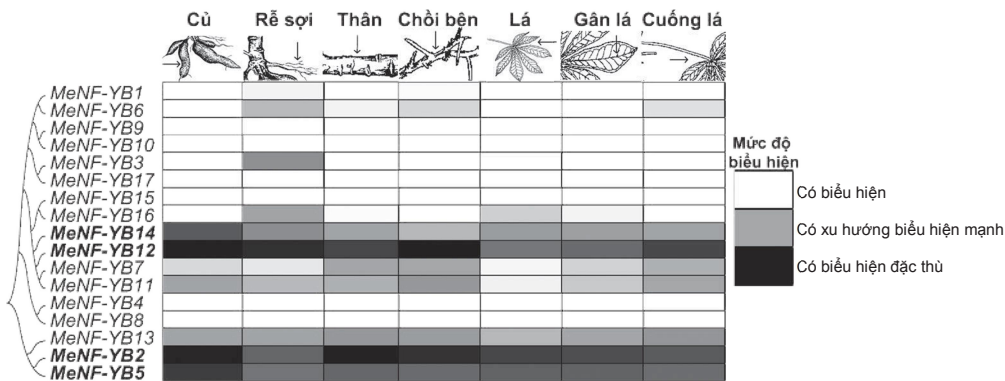


**Hình 1.** Cây phân loại của tiểu phân NF-YB ở sắn, đậu tương và *A. thaliana*

Từ giá trị bootstrap trên nhánh của cây phân loại cho thấy các tiểu phân NF-YB có thể được chia làm 2 nhóm chính. Trong đó, nhóm 1 gồm 3 phân nhóm, lần lượt là 1<sub>A</sub>, 1<sub>B</sub> và 1<sub>C</sub>, trong khi chỉ có 3 thành viên MeNF-YB ở sắn thuộc nhóm 2. Đáng chú ý, 3 thành viên của họ NF-YB ở sắn được xác định nằm cùng với một số NF-YB ở đậu tương và *A. thaliana* (Hình 1). Cụ thể, AtNF-YB01, được ghi nhận gần đây có liên quan đến tính chống chịu ở *A. thaliana* (Nelson *et al.*, 2007), cùng nhánh với thành viên MeNF-YB12. Bên cạnh đó, 2 thành viên của họ NF-YB ở đậu tương, GmNF-YB06 và GmNF-YB02 (Quach *et al.*, 2015), lần lượt nằm cùng phân lớp với MeNF-YB16 và MeNF-YB14 (Hình 1). Trước đó, các protein nằm trong cùng một nhánh trên cây phân loại thường chia sẻ chức năng tương tự nhau (Ha *et al.*, 2014). Như vậy, 3 gen mã hóa MeNF-YB12, -YB14 và -YB16 có thể đáp ứng với điều kiện hạn, tương tự như các NF-YB tương đồng trên đậu tương (Quach *et al.*, 2015) và *A. thaliana* (Nelson *et al.*, 2007).

**3.3. Kết quả phân tích dữ liệu biểu hiện của gen mã hóa NF-YB**

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của họ gen mã hóa NF-YB ở sắn được phân tích dựa trên dữ liệu microarray (Wilson *et al.*, 2017). Kết quả cho thấy tất cả các gen *MeNF-YB* đều có biểu hiện ở 7 cơ quan chính trên cây. Đặc biệt, 4 gen *MeNF-YB* được xác định có biểu hiện mạnh ở tất cả mẫu mô, đồng thời đặc thù ở ít nhất 1 vị trí (Hình 2). Trong đó, *MeNF-YB2* biểu hiện đặc thù ở thân và củ, MeNF-YB12 được tập trung mạnh ở củ và chồi bên. Trước đó, 2 gen này cũng đã được xác định có biểu hiện đặc thù lần lượt ở mô sẹo phôi hóa và mô phân sinh đỉnh rễ (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017). Bên cạnh đó, hai gen *MeNF-YB5* và -YB14 cũng có biểu hiện mạnh ở củ (Hình 2).



**Hình 2.** Mức độ biểu hiện của họ gen mã hóa NF-YB ở 7 mô trong điều kiện thường

Phân tích cho thấy, *MeNF-YB12* và *-YB14* được dự đoán có thể đáp ứng với điều kiện hạn (Hình 1), 2 gen này đều biểu hiện mạnh ở 7 mô chính trong điều kiện thường (Hình 2). Vùng promoter của 2 gen này đều chứa các CRE đáp ứng bất lợi và hóc môn (Bảng 1). Hơn nữa, yếu tố ABRE được tìm thấy trên vùng promoter của gen *MeNF-YB14* (Bảng 1). Có thể thấy rằng, 2 gen này đóng vai trò quan trọng trong cơ chế đáp ứng và chống chịu với điều kiện ngoại cảnh ở sắn. Trong đó, *MeNF-YB14* và *-YB12* có thể đáp ứng với điều kiện hạn thông qua con đường phụ thuộc và không phụ thuộc ABA.

#### IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Vùng promoter của họ gen mã hóa NF-YB ở sắn chứa số lượng lớn CRE đáp ứng hóc môn và đáp ứng bất lợi. Trong đó, tất cả các CRE đáp ứng bất lợi đều được xác định trên vùng promoter của 2 gen *MeNF-YB12* và *-YB14*.

Tiểu phần NF-YB ở sắn, đậu tương và *A. thaliana* được chia làm 2 nhóm chính trên cây phân loại. Ba thành viên, *MeNF-YB12*, *-YB14* và *-YB16* được xác định tương đồng và xếp cùng nhánh với các NF-YB đậu tương và *A. thaliana* liên quan đến tính chống chịu hạn.

Các gen *MeNF-YB* có biểu hiện ở 7 cơ quan chính trên cây trong điều kiện thường. Gen *MeNF-YB2* biểu hiện đặc thù ở thân và củ trong khi *MeNF-YB12* được xác định đặc thù ở củ và chồi bên. Hai gen *MeNF-YB5* và *-YB14* có biểu hiện mạnh ở củ. *MeNF-YB14* và *-YB12* có thể liên quan đến tính chống chịu với điều kiện hạn thông qua cơ chế phụ thuộc và không phụ thuộc ABA.

##### 4.2. Đề nghị

Mức độ biểu hiện của các gen mã hóa NF-YB ở sắn sẽ được định lượng trong nghiên cứu tiếp theo nhằm kiểm chứng khả năng đáp ứng của gen trong điều kiện bất lợi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

**Chu Đức Hà, Lê Thị Thảo, Lê Quỳnh Mai, Phạm Thị Lý Thu**, 2017. Xác định các gen mã hóa Nuclear factor-YB trên sắn (*Manihot esculenta* Crantz) bằng công cụ tin sinh học. *Tap chí Khoa học ĐHQGHN*, 33(1S): 133-137.

**Chu, H. D., Le, Q. N., Nguyen, H. Q., Le, D. T.**, 2016. Genome-wide analysis of gene encoding methionine-

rich proteins in *Arabidopsis* and soybean suggesting their roles in the adaptation of plants to abiotic stress. *Int J Genomics*, 2016: 1-8.

- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S.**, 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*, 40 (Database issue): D1178-D1186.
- Ha, C. V., Esfahani, M. N., Watanabe, Y., Tran, U. T., Sulieman, S., Mochida, K., Nguyen, D. V., Tran, L. S.**, 2014. Genome-wide identification and expression analysis of the CaNAC family members in chickpea during development, dehydration and ABA treatments. *PloS One*, 9(12): e114107.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.**, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7): 1870-1874.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Niebel, A.**, 2013. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci*, 18(3): 157-166.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Rombauts, S.**, 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30(1): 325-327.
- Nelson, D. E., Repetti, P. P., Adams, T. R., Creelman, R. A., Wu, J., Warner, D. C., Anstrom, D. C., Bensen, R. J., Castiglioni, P. P., Donnarummo, M. G., Hinchey, B. S., Kumimoto, R. W., Maszle, D. R., Canales, R. D., Krolikowski, K. A., Dotson, S. B., Gutterson, N., Ratcliffe, O. J., Heard, J. E.**, 2007. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(42): 16450-16455.
- Quach, T. N., Nguyen, H. T., Valliyodan, B., Joshi, T., Xu, D., Nguyen, H. T.**, 2015. Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response. *Mol Genet Genomics*, 290(3): 1095-1115.
- Wilson, M. C., Mutka, A. M., Hummel, A. W., Berry, J., Chauhan, R. D., Vijayaraghavan, A., Taylor, N. J., Voytas, D. F., Chitwood, D. H., Bart, R. S.**, 2017. Gene expression atlas for the food security crop cassava. *New Phytol*, 213(4): 1632-1641.
- Zanetti, M. E., Ripodas, C., Niebel, A.**, 2017. PlantNF-Y transcription factors: Key players in plant-microbe interactions, root development and adaptation to stress. *Biochim Biophys Acta*, 1860(5): 645-654.

## Study on structure of genes encoding Nuclear factor-YB subunit associated with drought tolerance in cassava

Chu Duc Ha, La Viet Hong, Le Hoang Thu Phuong,  
Le Thi Thao, Hoang Thi Thao, Pham Thi Ly Thu

### Abstract

Nuclear factor-YB (NF-YB), one of three basic subunits formed Nuclear factor-Y, is considered to play important roles in various biological processes in the plant cell. In this study, various hormone- and stress- responsive *cis*- regulatory elements were found in the promoter regions of 17 identified *MeNF-YB* genes. Among them, promoter regions of *MeNF-YB12* and *-YB14* genes were predicted to contain many stress- responsive regulatory elements. Construction of phylogenetic tree showed that *MeNF-YB12*, *-YB14* and *-YB16* were clustered into the same branches with well-known NF-YB in soybean and *Arabidopsis thaliana*, suggesting that these members might be linked to drought tolerance. *MeNF-YB* genes were expressed in 7 major organs in plant in normal condition. Interestingly, *MeNF-YB2* and *-YB12* were exclusively expressed in stem, storage root and root, lateral bud, respectively. Additionally, *MeNF-YB5* and *-YB14* were also strongly expressed in roots. Our results suggested that *MeNF-YB14* and *-YB12* might be responsive to drought condition in cassava.

**Keywords:** Nuclear factor-YB, cassava, stress condition, promoter, expression profile

Ngày nhận bài: 26/3/2018

Ngày phản biện: 5/4/2018

Người phản biện: TS. Dương Xuân Tú

Ngày duyệt đăng: 10/5/2018