

CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN *OsCBL4* VÀ *OsCBL5* THAM GIA VÀO QUÁ TRÌNH TRUYỀN TÍN HIỆU KHI LÚA (*Oryza sativa* L.) BỊ NGẬP Ở GIAI ĐOẠN NẤY MẦM

Hồ Viết Thế^{1*}, Pierdomenico Perata², Chiara Pucciariello²

¹*Trường đại học Công nghiệp thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh*

²*PlantLab, Institute of Life Sciences, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy*

Email*: hoviethethe@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

OsCIPK15 là gen quan trọng kiểm soát sự phân giải tinh bột để tạo năng lượng cho lúa khi bị ngập úng. Gen này nhận tín hiệu ngập úng thông qua các gen cảm biến canxi (*OsCBL*). Tuy nhiên, vai trò của các *OsCBL* trong cây lúa khi bị ngập ở giai đoạn nảy mầm vẫn chưa được sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu sự biểu hiện của các *OsCBL* ở lúa nảy mầm trong điều kiện ngập nước. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của canxi lên sự hoạt động của các *OsCBL* promoter và sự tương tác protein giữa *OsCBL* và *OsCIPK15* cũng được đánh giá. Kết quả chỉ ra rằng hai gen *OsCBL4* và *OsCBL5* biểu hiện mạnh hơn trong điều kiện ngập nước. Ngoài ra protein của *OsCBL4* và *OsCBL5* có thể tương tác với protein *OsCIPK15* trong tế bào trần lá lúa và sự tương tác này bị ảnh hưởng bởi nồng độ canxi. Với kết quả này, chúng tôi cho rằng tín hiệu canxi hình thành trong điều kiện ngập úng được *OsCBL4* và *OsCBL5* nhận sau đó tương tác với *OsCIPK15* để kích hoạt những gene liên quan đến quá trình thủy phân tinh bột và đường phân để tạo năng lượng cho hạt nảy mầm.

Từ khóa: Canxi, *OsCBL* (calcineurin B-like ở lúa), *OsCIPK15* (calcineurin B-like interacting protein kinase 15 ở lúa), ngập úng, *Oryza sativa*.

Calcineurin B-Like Protein Cbl4 and Cbl5 Participate in Signal Transduction in Germinating Rice (*Oryza sativa* L.) under Water Submergence

ABSTRACT

OsCIPK15 is a key regulator of starch degradation in rice due to submergence. This gene receives submergence signal via calcineurin B-like (*OsCBL*) proteins, which act as the Ca^{2+} sensors, and whose role has yet to be established. In the present study, we compared the transcriptional regulation of *CBLs* in germinating rice embryos under water submergence. The trans-activation of *OsCBL* promoters was tested by examining the effects of Ca^{2+} . We used rice protoplasts to study the *OsCBLs*-*OsCIPK15* protein interactions. We found that *OsCBL4* and *OsCBL5* were transcriptionally regulated under submergence. The Ca^{2+} sensors *OsCBL4* and *OsCBL5* were involved in this system and interacted on the plasma-membrane with *OsCIPK15* in Ca^{2+} dependent manner. Our results suggest that Ca^{2+} signaling formed under submergence are induced by *OsCBL4* and *OsCBL5* which then interact with *OsCIPK15* to activate genes involving in starch catabolism to provide energy for rice germination.

Keywords: *OsCBL* (calcineurin B-like in rice), *OsCIPK15* (calcineurin B-like interacting protein kinase 15), Submergence, *Oryza sativa*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhờ vào khả năng hoạt động của các enzyme amylase trong điều kiện thiếu oxy, lúa là cây duy nhất trong các cây ngũ cốc có thể nảy

mầm ở điều kiện ngập nước (Alpi and Beevers, 1983; Perata and Alpi, 1993). Trong điều kiện bị ngập, lúa nhanh chóng tiêu thụ hết lượng đường hòa tan có sẵn, sự thiếu hụt đường nội sinh sẽ gây ra tín hiệu chuyên biệt để kích thích sản

xuất các enzyme phân hủy tinh bột. Trong đó Ramy3D là enzyme được sản xuất ra nhiều và có vai trò quan trọng nhất trong cây lúa trong điều kiện bị ngập úng (Loreti et al., 2003). Tinh bột sau khi được phân giải bởi Ramy3D sẽ được chuyển vào chu trình đường phân để tạo năng lượng ATP, duy trì hoạt động sống của cây lúa (Perata et al., 1992, 1993, 1997).

OsCIPK 15 (calceineurin B-like (*OsCBL*) interacting protein kinase 15) đã được chứng minh có liên quan trong việc nhận tín hiệu giảm oxy (O_2) phát sinh khi cây ngập nước, sau đó sẽ kích thích sự hoạt động của SnRK1 (Snf1-related protein kinase), gen có vai trò điều khiển sự cân bằng năng lượng trong cây ở điều kiện bất lợi (Lee et al., 2009; Lu et al., 2002; 2007). Trong khi đó, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng protein *OsCBL* đóng vai trò cảm nhận trực tiếp sự thay đổi nồng độ canxi (Ca^{2+}) gây ra bởi các điều kiện ngoại cảnh bất lợi (ví dụ: thiếu O_2 , mặn, hạn,...) và tương tác với các *OsCIPK* để kích hoạt những gen phía sau liên quan đến quá trình thích nghi và chống chịu của thực vật (Albrecht et al., 2003; Kolukisaoglu et al., 2004; Luan, 2008). Các gen mã hóa cho protein *OsCBL* cho đến nay chỉ được phát hiện trong thực vật và chúng có cấu tạo tương tự như tiểu đơn vị β trong calcineurin (CNB) và các thụ thể cảm nhận Ca^{2+} trong tế bào thần kinh ở động vật (Liu and Zhu, 1998; Kudla et al., 1999; Xu et al., 2006). Tương tác CBL-CIPK liên quan đến rất nhiều các quá trình truyền tín hiệu Ca^{2+} trong điều kiện môi trường bất lợi và những nghiên cứu này chủ yếu được thực hiện trên cây *Arabidopsis* (Shi et al., 2000; D'Angelo et al., 2006; Horie et al., 2012).

Cho tới nay, các nhà khoa học đã phát hiện 31 gen *OsCIPK* và 10 *OsCBL* trên lúa (Kolukisaoglu et al., 2004; Piao et al., 2010) nhưng chỉ rất ít các gen này được nghiên cứu và làm sáng tỏ chức năng. Tiêu biểu là sự tương tác giữa *AtCIPK24* và *AtCBL4* có tác dụng chịu mặn ở cây *Arabidopsis* vì sự tương tác này kích thích bơm Na^+ ra ngoài tế bào. Martiniez et al. (2007) cũng cho rằng sự tương tác này cũng có vai trò tương tự trên lúa. Tuy nhiên, các nghiên cứu để xác định những *OsCBL* có khả năng tương tác với *OsCIPK15* và vai trò của Ca^{2+} đối

với sự tương tác này vẫn chưa được quan tâm trên cây lúa. Nghiên cứu này chứng tỏ rằng gen *OsCBL4* và *OsCBL5* có khả năng cảm ứng sự ngập úng của cây lúa theo cùng xu hướng của 2 gen *OsCIPK15* và *Ramy3D* đã được biết trước đây. Ngoài ra, nghiên cứu còn phát hiện hai protein *OsCBL4* và *OsCBL5* có khả năng tương tác với protein *OsCIPK15* và sự tương tác này phụ thuộc vào nồng độ Ca^{2+} trong điều kiện thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu thập mẫu

Hạt lúa thuộc giống Nipponbare được làm sạch vỏ, khử trùng bề mặt với dung dịch natri hypochlorite 5% trong 20 phút, sau đó rửa sạch lại nhiều lần bằng nước cất, phôi lúa được tách cẩn thận khỏi phần nội nhũ để loại bỏ những ảnh hưởng không mong muốn từ bộ phận này tới kết quả thí nghiệm. Đối với những thí nghiệm phân tích biểu hiện gen, phôi lúa được chia thành 2 phần bằng nhau và được xử lý ở các điều kiện như sau: i) trên cạn: phôi hạt được nảy mầm bằng cách ủ trên nhiều lớp giấy lọc sạch được làm ẩm bằng nước cất; ii) ngập nước: phôi hạt được nảy mầm trong điều kiện ngập hoàn toàn trong nước cất. Mẫu được thu vào thời điểm 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 ngày sau xử lý, được làm lạnh nhanh trong ni tơ lỏng và bảo quản ở $-80^\circ C$ cho đến khi sử dụng.

2.2. Ly trích RNA và phân tích biểu hiện gen

RNA tổng số được ly trích từ phôi lúa bằng bộ kit Spectrum™ Plant RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA) và dùng Turbo DNA-free™ Kit (Applied Biosystem, USA) để loại bỏ sự lẫn tạp DNA. Một microgram RNA được sử dụng để tổng hợp cDNA với iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, USA), tất cả các bước đều tuân theo quy trình khuyến cáo của nhà sản xuất. Phản ứng real-time PCR được thực hiện với iTaq supermix (Biorad, USA) và các cặp primer đặc hiệu (Bảng 1) trên máy ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem, USA). Mức độ biểu hiện gen được đánh giá bằng cách so sánh với mức độ biểu hiện của gen chuẩn *OsActin1*.

Calcineurin B-like protein OSCBL4 và OSCBL5 tham gia vào quá trình truyền tín hiệu khi lúa (*Oryza sativa* L.) bị ngập ở giai đoạn nảy mầm

Bảng 1. Danh sách các primer sử dụng trong realtime PCR và cloning

Gen mục tiêu	Tên primer	Trình tự primer (5'-3')	Mục đích sử dụng
LOC_Os05g45810	Real_OsCBL4_fw	AGGACATTACCATGGCGTTC	Real-time PCR
	Real_OsCBL4_rv	CGAGCTTCAGCAACAATGGA	
LOC_Os01g41510	Real_OsCBL5_fw	GACCAGGAGGAGTGAATGA	Real-time PCR
	Real_OsCBL5_rv	TCTGCTTCGCTGACTTCTGA	
LOC_Os11g02240	Real_OsCIPK15_fw	TGCGGTTGGTGGCTCATAA	Real-time PCR
	Real_OsCIPK15_rv	TTGTTCCGTGTGCCATGAC	
LOC_Os08g36910	Real_Ramy3D_fw	AGGCAGGCTCTCTAGCCTCT	Real-time PCR
	Real_Ramy3D_rv	ACTGCATCCTGAACCTGACA	
LOC_Os03g50890	Real_OsActin1_fw	ACAGGTATTGTGTGGACTCTGG	Real-time PCR
	Real_OsActin1_rv	AGTAACCACGCTCCGTCAGG	
LOC_Os05g45810	PENTR_OsCBL4_fw	CACCATGGGATGCGCGCTCG	Clone <i>OsCBL4</i>
	PENTR_OsCBL4_rv1	TCAGTCATGGGCTTCTGAATGC	
LOC_Os01g41510	PENTR_OsCBL5_fw	CACCATGATGGGCTGTCTA	Clone <i>OsCBL5</i>
	PENTR_OsCBL5_rv1	TTAGGCAACCATGTCTGC	
LOC_Os011g02240	PENTR_OsCIPK15_fw	CACCATGGAGAGTAGAGGGA	Clone <i>OsCIPK15</i>
	PENTR_OsCIPK15_rv1	CTAGGCCAAGACAATGTCTCTC	
LOC_Os05g45810	OsCBL4_pro_fw	CACCGAAAAACACACGCTGAGC	Clone <i>OsCBL4</i> promoter
	OsCBL4_pro_rv	CGAACGATGCCTTCGCCGA	
LOC_Os01g41510	OsCBL5_pro_fw	CACCGTCACAGATAAAGTACTA	Clone <i>OsCBL5</i> promoter
	OsCBL5_pro_rv	AAAAATCCACACCCAGCAG	

2.3. Ly trích tế bào trần và thực hiện biến nạp

Lá cây *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* dòng Col-0) từ 4 - 5 tuần tuổi hoặc lá lúa 7 - 10 ngày tuổi được sử dụng để ly trích tế bào trần sử dụng phương pháp của Sheen (2002) và Zhang et al. (2011). Quá trình biến nạp được thực hiện theo phương pháp của Yoo et al. (2007). Các tế bào trần sau biến nạp được giữ ở trong tối với nhiệt độ 25°C qua đêm. Tế bào trần được sử dụng để đánh giá sự tương tác giữa các protein hoặc hoạt động của các gen promoter.

2.4. Đánh giá hoạt động của gen promoter

DNA tổng số từ lúa được ly trích với GenELute Plant Genomic DNA minprep kit (Sigma, USA). 2kb DNA phía trước codon bắt đầu của *OsCBL4* và *OsCBL5* được thu nhận dựa trên phản ứng PCR có sử dụng enzyme DNA polymerase độ chính xác cao (Phusion TM, New England Biolabs, UK). Các đoạn DNA này được gắn vào pENTR TOPO vector và được giải trình tự để kiểm tra độ chính xác

trong quá trình thực hiện phản ứng PCR. Sau đó pENTR TOPO vector chứa các gen trải qua phản ứng tái tổ hợp để chuyển vào vector pGWL7 GATEWAY, đây là vector có chứa gen mã hóa protein firefly luciferase được điều khiển bởi promoter 35S.10µg plasmid từ vector pGWL7 GATEWAY được dùng để biến nạp vào tế bào trần ly trích từ lá *Arabidopsis*. Vector 35S::Renila LUC được biến nạp đồng thời để làm đối chứng chuẩn. Sự hoạt động của các promoter được phát hiện bằng cách sử dụng bộ kit dual LUC reporter assay (Promega, USA) và đo bằng máy Lumat LB9507 Tube Luminometer (Berhold Technologies, USA). Các phản ứng được lặp lại 4 lần.

Mức độ hoạt động của các promoter thông qua hoạt tính của protein LUC ở các nghiệm thức khác được chuyển đổi tương đối với nghiệm thức đối chứng theo công thức: Mức độ hoạt động của promoter (%) = (giá trị của protein LUC của mỗi nghiệm thức/giá trị của protein LUC của nghiệm thức đối chứng) x 100.

2.5. Đánh giá sự tương tác giữa các protein

Sau khi tổng hợp cDNA, *OsCBL4*, *OsCBL5* và *OsCIPK15* được khuếch đại bằng phản ứng PCR có sử dụng enzyme DNA polymerase có độ chính xác cao (Phusion TM, New England Biolabs, UK), 0,25mm primer và 20ng cDNA. Sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose 1% và xác định đúng kích thước mong muốn, band chứa sản phẩm PCR được cắt và tinh sạch bằng kit Wizard® SV Gel and the PCR Clean-Up System (Promega, USA). Sản phẩm PCR tinh sạch được gắn vào vector pENTR TOPO (Invitrogen, USA), độ chính xác của gen được kiểm tra bằng cách giải trình tự DNA. Các vector pENTR TOPO chứa *OsCBL4* và *OsCBL5* được tái tổ hợp vào vector pDH51-GW-YFPN, đây là vector có chứa đầu N của protein YFP. Trong khi đó vector pENTR TOPO chứa *OsCIPK15* được tái tổ hợp vector pDH51-GW-YFPC, đây là vector có chứa đầu C của protein YFP. 10µg plasmid từ mỗi cấu trúc được sử dụng trong biến nạp vào tế bào trần ly trích từ lá lúa. Các vector không chứa *OsCBL4/5* và *OsCIPK15* được sử dụng làm đối chứng âm. Sau khi tế bào trần được biến nạp và ủ qua đêm, tín hiệu huỳnh quang tạo ra do sự tương tác giữa *OsCBL4/5* và *OsCIPK15* được quan sát dưới kính hiển vi Niko Eclipse Ti-S (Nikon, Nhật Bản).

3. KẾT QUẢ

3.1. Xác định ảnh hưởng của ngập nước đến sự biểu hiện của các *OsCBL*

OsCIPK15 của lúa đã được biết đến như là một gen chủ chốt trong quá trình truyền tín hiệu ở lúa khi bị ngập (Lee et al., 2009; Kudahettige et al., 2011). Vào năm 2010, Kurusu et al. khi sử dụng phương pháp yeast two-hybrid (xác định các protein tương tác bằng cách sử dụng tế bào nấm men) đã xác định được *OsCIPK15* có thể tương tác với nhiều *OsCBL*

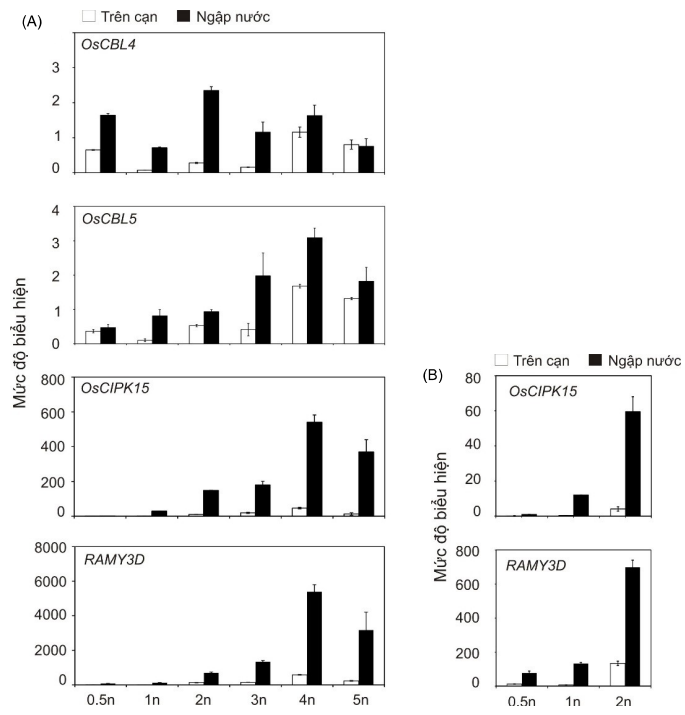
như *OsCBL2*, 3, 4, 5 và 6 ở trong tế bào nấm men. Trong đó, *OsCBL4* được phát hiện là có tương tác mạnh nhất với *OsCIPK15*, ngoài ra *OsCBL5* được Sadiq et al. (2011) công bố là biểu hiện rất mạnh trong điều kiện thiếu O_2 ở cả mức độ phiên mã và dịch mã. Vì vậy, chúng tôi chọn hai gen này để nghiên cứu. Chúng tôi phát hiện sự biểu hiện của *CBL4* và *CBL5* tăng dưới điều kiện ngập nước. Sự biểu hiện của hai gen này cùng xu hướng biểu hiện của 2 gen đã được nghiên cứu kỹ trước đây là *CIPK15* và *Ramy3D* (Hình 1).

3.2. Vai trò của canxi trong sự hoạt động của *OsCBL4* và *OsCBL5* promoter

Nhiều nhóm nghiên cứu đã đưa ra kết quả để chứng minh rằng protein CBL có vai trò là phân tử cảm nhận sự thay đổi nồng độ Ca^{2+} trong tế bào dưới tác dụng của các kích thích khác nhau, những protein này sau đó sẽ kết hợp với những protein CIPK khác nhau và chuyển tín hiệu Ca^{2+} này để khởi động những gen phía sau trong con đường truyền tín hiệu (Hepler, 2005; Luan, 2008).

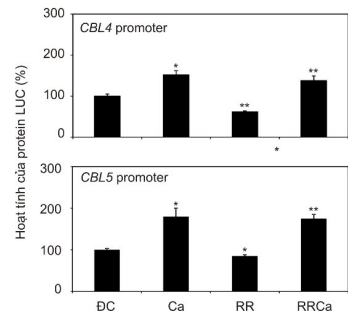
Để đánh giá chi tiết hơn vai trò của Ca^{2+} đến mức độ biểu hiện của 2 gen *OsCBL4* và *OsCBL5*, 2kb vùng promoter của 2 gen này được gắn vào vector biểu hiện có mang gen mã hóa firefly luciferase protein sau đó được biến nạp vào tế bào trần của lá Arabidopsis và được đánh giá ở trong điều kiện các nồng độ Ca^{2+} khác nhau (Hình 2). Kết quả cho thấy khi bổ sung Ruthenium Red (RR, đây là chất có khả năng làm ngăn cản quá trình vận chuyển Ca^{2+} trong tế bào cũng như đóng vai trò ức chế quá trình vận chuyển tín hiệu liên quan tới Ca^{2+} (Pinosos and Tester, 1997; Anil and Rao, 2011) hoạt động của promoter bị giảm rõ rệt, ngược lại khi được bổ sung thêm Ca^{2+} , tín hiệu của protein này được hồi phục ở mức ngang bằng với tín hiệu của nghiệm thức không bổ sung RR (Hình 2).

Calcineurin B-like protein OSCBL4 và OSCBL5 tham gia vào quá trình truyền tín hiệu khi lúa (*Oryza sativa* L.) bị ngập ở giai đoạn nảy mầm



Hình 1. So sánh mức độ biểu hiện của *OsCBL4*, *OsCBL5*, *OsCIPK15* và *Ramy3D* trong các điều kiện nảy mầm khác nhau

Ghi chú: (A). Phóng đại mức độ biểu hiện của *OsCIPK15* và *Ramy3D* trong khoảng thời gian từ 0,5; 1 và 2 ngày sau khi hạt lúa nảy mầm (B) (n: ngày sau khi hạt bắt đầu nảy mầm).



Hình 2. Ảnh hưởng của Ca^{2+} tới sự hoạt động của promoter *OsCBL4* và *OsCBL5*

Ghi chú: **: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$ theo T-test. ĐC: đối chứng; Ca: bổ sung 50mM Ca^{2+} ; RR: bổ sung 50 μ M Ruthenium Red.

3.3. Sự tương tác giữa *OsCBL4* và *OsCBL5* với *OsCIPK15* phụ thuộc vào nồng độ Ca^{2+}

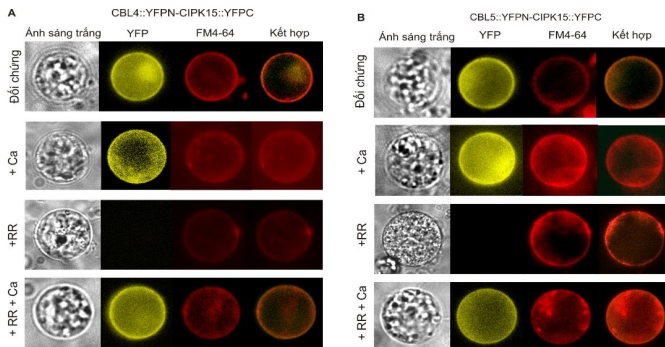
Chúng tôi sử dụng kỹ thuật BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) để xác định khả năng tương tác giữa protein *OsCBL4* và *OsCBL5* với protein *OsCIPK15*. Trong kỹ thuật này, *OsCBL4* và *OsCBL5* được gắn vào đầu N của protein YFP, trong khi đó *OsCIPK15* được gắn vào đầu C của protein YFP. Cấu trúc gen *OsCIPK15* được biến nạp vào tế bào trần của lá lúa cùng với cấu trúc gen *OsCBL4* hoặc *OsCBL5*. Chúng tôi thấy phần lớn tín hiệu thu được tập trung ở màng tế bào (Hình 3), điều này được khẳng định bằng cách sử dụng chất nhuộm màng tế bào chuyên biệt FM4-64. Theo chúng tôi, tín hiệu này là chuyên biệt phát sinh khi có sự tương tác giữa các protein vì các nghiệm thức đối chứng âm với các vector không chứa gen đều không có tín hiệu. Bên cạnh đó, một số ít tín hiệu được phát hiện nằm rải rác bên trong tế bào chất, chứng tỏ sự tương tác có thể cũng xảy ra ở trong bộ phận này của tế bào. Sự tương tác giữa *OsCBL4* và *OsCBL5* với *OsCIPK15* phụ thuộc vào sự có mặt của Ca^{2+} trong tế bào, bởi vì trong nghiệm thức có bổ sung RR, tín hiệu phát ra từ YFP không xuất hiện, ngược lại tín hiệu này được phát hiện trở lại khi nghiệm thức có chứa RR được bổ sung thêm Ca^{2+} .

4. THẢO LUẬN

Khả năng nảy mầm của lúa trong điều kiện ngập nước là do khả năng hoạt động của enzyme Ramy3D (Perata et al., 1997). Gần đây, Lee et al. (2009) đã tìm và xác định được gen mã hóa cho enzyme này là *OsCIPK15*. Những nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng để thực hiện chức năng điều khiển những gen khác, *AtCIPK* protein phải tương tác với các protein *AtCBL*, đây là những protein đóng vai trò cảm nhận trực tiếp sự thay đổi nồng độ Ca^{2+} trong tế bào (Luan, 2008; Weinl and Kudla, 2009). Nồng độ Ca^{2+} trong tế bào của cây ngô và cây *Arabidopsis* thay đổi bởi nhiều kích thích khác nhau và sự thay đổi ion kim loại này do thiếu O_2 đã được biết đến gần hai thập kỷ trước đây (Subbaiah et al., 1994; Sedbrook et al., 1996). Gần đây hơn, sự tăng nồng độ Ca^{2+} trong tế bào chất của lúa khi thiếu O_2 cũng đã được phát hiện (Yemelyanov et al., 2011).

Ở lúa, các gen *OsCBL* đã được phát hiện là có phản ứng ở mức độ phiên mã khi cây bị các điều kiện bất lợi của môi trường (Gu et al., 2008); ở mức độ sau dịch mã, protein *OsCBL4* và *OsCBL5* đã được xác định có sự tương tác với protein *CIPK15* (Kurusu et al., 2010).

Trong nghiên cứu này chúng tôi xác định được hai gen *OsCBL4* và *OsCBL5* ở lúa hoạt



Hình 3. Đánh giá sự tương tác protein giữa *OsCBL4* và *OsCIPK15* (A), *OsCBL5* và *OsCIPK15* (B)

Ghi chú: Ca: bổ sung 50mm Ca^{2+} ; RR: bổ sung 50 μM Ruthenium Red

động mạnh hơn dưới điều kiện ngập nước ở giai đoạn nảy mầm. Xu hướng này tương tự như những gen đặc trưng cho phản ứng của cây lúa khi bị ngập nước đã được biết trước đây như *OsCIPK15* và *OsRamy3D* (Hình 1). Ngoài ra, vùng promoter của 2 gen *OsCBL4* và *OsCBL5* có sự hiện diện của nhiều vùng cảm nhận Ca^{2+} (Gu et al., 2008), chứng tỏ hai gen này có khả năng phản ứng lại sự thay đổi nồng độ Ca^{2+} . Điều này phù hợp với kết quả của chúng tôi, sự hoạt động của promoter ở *OsCBL4* và *OsCBL5* tăng lên khi được bổ sung thêm Ca^{2+} và bị giảm đáng kể khi giảm Ca^{2+} bằng cách sử dụng RR (Hình 2).

Các protein *AtCBL* đã được biết đến với vai trò truyền tín hiệu Ca^{2+} (Luan, 2008) do sự hiện diện của các EF-hand motif (Weinl and Kudla, 2009). Trong cấu trúc bậc ba, cả *OsCBL4* và *OsCBL5* đều chứa 4 EF-hand motif (Gu et al., 2008), đây là những cấu trúc đóng vai trò liên kết với Ca^{2+} của protein. Điều này giải thích tầm quan trọng của Ca^{2+} trong sự tương tác giữa *OsCBL4* và *OsCBL5* với *OsCIPK15* (Hình 3). Protein *OsCBL4* và *OsCBL5* có chứa vùng myristoylation ở đầu amin làm cho các protein này có khả năng gắn kết vào màng tế bào (Kolukisoglu et al., 2004). Những nghiên cứu về *AtCBL* ở cây *Arabidopsis* chỉ ra rằng protein *AtCBL* đóng vai trò quyết định vị trí tương tác với protein *AtCIPK* trong tế bào (D'Angelo et al., 2006; Batistic et al., 2010). Kết quả của chúng tôi cho thấy sự tương tác giữa *OsCBL4* và *OsCBL5* với *OsCIPK15* xảy ra chủ yếu ở màng tế bào, khẳng định vai trò của các liên kết này đóng vai trò như những cảm biến cảm nhận sự thay đổi nồng độ Ca^{2+} từ màng tế bào dưới điều kiện ngập nước.

5. KẾT LUẬN

Với những kết quả đạt được, chúng tôi cho rằng *OsCBL4* và *OsCBL5* đóng vai trò truyền tín hiệu trong lúa ở điều kiện ngập nước thông qua sự tương tác với *OsCIPK15*. Sự truyền tín hiệu này được đảm bảo do sự hiện diện của Ca^{2+} trong tế bào dẫn đến sự tương tác giữa *OsCBL4* và *OsCBL5* với *OsCIPK15*, từ đó ảnh hưởng đến sự sản xuất và hoạt động của enzyme *Ramy3D* ở lúa trong điều kiện ngập. Hiện tại, những thí

th nghiệm chuyển các cấu trúc gen *OsCBL4*, *OsCBL5* và *OsCIPK15* với promoter hoạt động mạnh vào lúa và những thí nghiệm bất hoạt sự hoạt động của các gen này đang được tiếp tục thực hiện để tìm hiểu cụ thể hơn vai trò của chúng ở lúa trong điều kiện ngập nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, U., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., and Kudla, J. (2003). The calcium sensor CBL1 integrates plants responses to abiotic stresses. *Plant Journal*, 36: 457 - 470.
- Alpi, A., Beevers, H. (1983). Effects of O_2 concentration on rice seedling. *Plant Physiology*, 71: 30 - 34.
- Anil VS, Rao KS. 2001. Calcium-mediated signal transduction in plants: A perspective on the role of Ca^{2+} and CDPKs during early plant development. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1237 - 1256
- Batistić, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., and Kudla, J. (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant Journal*, 61: 211 - 222.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistić, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., and Kudla, J. (2006). Alternative complex formation of the Ca^{2+} -regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 48: 857 - 872.
- Gu, Z., Ma, B., Jiang, Y., Chen, Z., Su, X., and Zhang, H. (2008). Expression analysis of the calcineurin B-line gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses. *Gene*, 415: 1 - 12.
- Hepler, P.K. (2005). Calcium: A central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17: 2142 - 2155.
- Horie, T., Karahara, I., and Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central locus on rice plants. *Rice*, 5: 11.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazervic, D., Batistic, O., and Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134: 43 - 58.
- Kudahettige, N.P., Pucciariello, C., Alpi, A., and Perata, P. (2011). Regulatory interplay of the SUB1A and CIPK15 pathways in the regulation of α -amylase production in flooded rice plants. *Plant Biology*, 4: 611 - 619.

- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grissem, W., and Luan, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 96: 4718 - 4723.
- Kurusu, T., Hamada, J., Nokajima, H., Kitagawa, Y., Kiyoduka, M., Takahashi, A., Hanamata, S., Ohno, R., Hayashi, T., Okada, K., Koga, J., Hirochika, H., Yamane, H., and Kuchitsu, K. (2010). Regulation of Microbe-associated molecular pattern-induced hypersensitive cell death, phytoalexin production, and defense gene expression by Calcium B-like protein-interacting protein kinases, OsCIPK14/15, in rice cultured cells. *Plant Physiology*, 153: 678 - 692.
- Lee, K.W., Chen, P.W., Lu, C.A., Chen, S., Ho, T.H.D., and Yu, S.M. (2009). Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci. Signal*, 2: ra61.
- Liu, J., and Zhu, J.K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280: 1943 - 1945.
- Loreti, E., Alpi, A., and Perata, P. (2003). α -amylase expression under anoxia in rice seedlings: an update. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50: 737 - 742.
- Lu, C.A., Ho, T.H.D., Ho, S.L., and Yu, S.M. (2002). Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression. *Plant Cell*, 14: 1963 - 1980.
- Lu, C.A., Lin, C.C., Lee, K.W., Chen, J.L., Huang, L.F., Ho, S.L., Liu, H.J., Hsing, Y.L., and Yu, S.M. (2007). The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell*, 19: 2484 - 2499.
- Luan, S. (2008). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, 14(1). doi:10.1016/j.tplants.2008.10.005.
- Martinez-Atienza, J., Jiang, X., Garciasdeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M., and Quitero, F.J. (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143: 1001 - 1012.
- Perata, P. and Alpi, A. (1993). Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science*, 93: 1 - 17.
- Perata, P., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T., and Yamaguchi, J. (1992). Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta*, 188: 611 - 618.
- Perata, P., Guglielminetti, L., and Alpi, A. (1997). Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, 79: 49 - 56.
- Piao, H.L., Xuan, Y.H., Park, S.H., Je, B.I., Park, S.J., Park, S.H., Kim, C.M., Huang, J., Wang, G.K., Kim, M.J., Kang, S.M., Le, I.J., Kwon, T.R., Kim, Y.H., Yeo, U.S., Yi, G., Son, D.Y., and Han, C.H. (2010). OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress condition in rice plants. *Molecules and Cells*, 30: 19 - 27.
- Pineros M and Tester M. 1997. Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *Journal of Experimental Botany*, 48: 551 - 577.
- Sadiq, I., Fanucchi, F., Paparelli, E., Alpi, E., Bachi, A., Alpi, A., and Perata, P. (2011). Proteomic identification of differentially expressed proteins in the anoxic rice coleoptile. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2234 - 2243.
- Sedbrook, J.C., Kronebusch, P.J., Borisy, G.G., Trewavas, A.J., and Masson, P.H. (1996). Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca^{2+} responses to anoxia in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiology*, 111: 243 - 257.
- Sheen, J. (2002). A transient expression assay using Arabidopsis mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^{+}/H^{+} antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 97: 6896 - 6901.
- Subbiah, C.C., Bush, D.S., and Sachs, M.M. (1994a). Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *Plant Cell*, 6: 1747 - 1762.
- Weinl, S. and Kudla, J. (2009). The CBL-CIPK Ca^{2+} - decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184: 517 - 528.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Yang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H. (2006). A protein kinase, interacting with two Calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell*, 125: 1347 - 1360.
- Yemelyanov, V.V., Shishova, M.S., Chirkova, T.V., and Lindberg, S.M. (2011). Anoxia-induced elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration depends of different Ca^{2+} sources in rice and wheat protoplast. *Planta*, 234: 271 - 280.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocol*, 2: 1565 - 1572.
- Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., Wang, P., Li, Y., Liu, B., and Feng, D. (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7: 30.