

## NGHIÊN CỨU CHỨC NĂNG CỦA *NbWRKY79* TRONG SỰ PHÁT TRIỂN Ở THỰC VẬT BẰNG KỸ THUẬT CÂM LẶNG GENE CẢM ỨNG BỞI VIRUS

TRINH NGỌC NAM, DƯƠNG QUỐC CƯỜNG

*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh  
trinhngocnam@iuh.edu.vn*

**Tóm tắt.** *NbWRKY79* là một nhân tố phiên mã thuộc họ WRKY, được chứng minh có vai trò quan trọng trong sự đề kháng với stress mặn ở thực vật thông qua con đường tín hiệu liên quan đến abscisic acid (ABA). Tuy nhiên, vai trò của *NbWRKY79* đối với sự phát triển của thực vật chưa được xác định. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* ở mô hình cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* đã được làm giảm bằng kỹ thuật câm lặng gene cảm ứng bởi virus (VIGS). Sự sinh trưởng của cây thuốc lá có gene VIGS-*NbWRKY79* suy giảm rõ rệt về chiều cao, khối lượng tươi, kích thước lá so với cây đối chứng. Sự giảm biểu hiện của *NbWRKY79* cũng dẫn đến sự hạn chế phát triển của hoa hạt. Đặc biệt, sự tích tụ gốc oxy hoá tự do (Reactive oxygen species – ROS) gia tăng ở ở lá cây VIGS-*NbWRKY79* và cử động của khí khổng lá giảm rõ rệt khi xử lý bằng ABA ngoại sinh. Mô sẹo nuôi cấy *in vitro* từ mảnh lá cây giảm biểu hiện *NbWRKY79* hầu như không tái sinh sinh chồi. Những kết quả của nghiên cứu đã cho thấy vai trò quan trọng của *NbWRKY79* đối với nhiều quá trình phát triển của thực vật.

**Từ khóa.** *NbWRKY79*, sự câm lặng gene cảm ứng bởi virus, cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*, sự phát triển, gốc oxy hoá tự do

### FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *NbWRKY79* IN PLANT DEVELOPMENTAL PROGRAMS BY VIRUS-INDUCED GENE SILENCING

**Abstract.** *NbWRKY79*, a transcriptional factor belonging to the WRKY family, plays important roles in salt stress responses related to abscisic acid (ABA) pathway in the plant. However, the functional characteristics of *NbWRKY79* in plant development have not been investigated yet. In this study, the expression of *NbWRKY79* in *Nicotiana benthamiana* tobacco plants was reduced by virus-induced gene silencing (VIGS). The growth of VIGS-*NbWRKY79* tobacco plants was significantly decreased in height, fresh weight, and leaf size compared to the control plants. Especially, reactive oxygen species (ROS) accumulation was increased in leaves of VIGS-*NbWRKY79* plants but not in the control plants. Reducing of *NbWRKY79* expression in the tobacco plants also led to a limit in flower development and seed production. The stomata closure in leaves was significantly decreased under exogenous ABA treatment. The calli, which were generated from leaf segments of VIGS-*NbWRKY79* almost, did not generate shoots. Taken altogether, the results suggested the important roles of *NbWRKY79* in many development processes in plants.

**Keywords.** *NbWRKY79*, virus-induced gene silencing, *Nicotiana benthamiana* tobacco plant, development, reactive oxygen species (ROS)

#### 1. GIỚI THIỆU

Các nhân tố phiên mã là thành phần chủ chốt trong những con đường truyền tín hiệu ở thực vật trong sự phát triển và đáp ứng với tác động từ môi trường. Trình tự gene mã hoá các nhân tố phiên mã định vị tại vị trí phía trước gene mà nó kiểm soát sự biểu hiện. WRKY là nhóm nhân tố phiên mã có số lượng gene lớn nhất so với các nhóm nhân tố phiên mã khác, với 104 gene ở lúa và 74 gene ở *Arabidopsis* [1]. Tất cả các protein WRKY được đặc trưng bởi 1 hoặc 2 WRKY domain với trình tự amino acid WRKYGQK có tính bảo tồn cao tại đầu N và một cấu trúc motif ngón tay kẽm C2-H2 (zinc-finger motif C2-H2) tại đầu C. Phân tích phát sinh loài dựa trên số lượng WRKY domain và đặc điểm của cấu trúc zinc-finger phân chia các protein WRKY thành 3 nhóm I, II và III. Protein WRKY gắn với yếu tố W-box (TTGACC/T) tại vùng promoter của gene để điều hoà tăng hay giảm biểu hiện của gene ở cấp độ phiên mã [2]. Gần đây có nhiều bằng chứng cho thấy nhân tố phiên mã WRKY tham gia trong sự điều hoà dương hoặc âm đối với các hormone và đáp ứng với các stress vô sinh hoặc hữu sinh ở thực vật [3, 4, 5, 6]. Một số nghiên cứu cũng

cho thấy WRKY giữ vai trò quan trọng trong sự phát triển rễ và kiểm soát thời gian ra hoa [7]. Trong nghiên cứu trước của chúng tôi, gene mã hoá nhân tố phiên mã *NbWRKY79*, phân lập từ cây thuốc lá mô hình *Nicotiana benthamiana*, đã được chứng minh giữ vai trò quan trọng trong sự đáp ứng với stress mặn thông qua con đường tín hiệu liên quan đến ABA. Phân tích trình tự gene đã xác định *NbWRKY79*, chứa một WRKY domain và một zinc-finger motif C2H2, thuộc nhóm WRKY II. Đồng biểu hiện với protein phát huỳnh quang vàng (yellow fluorescent protein-YFP) đã xác định *NbWRKY79* hiện diện trong nhân tế bào. Ngoài ra, phân tích promoter bằng kỹ thuật nhuộm GUS ( $\beta$ -glucuronidase) cho thấy *NbWRKY79* biểu hiện mạnh trong đỉnh sinh trưởng chồi và rễ, hệ thống mạch dẫn ở rễ, gân và phiến lá, và các bộ phận của hoa [8]. Mặc dù vậy, chưa có nhiều nghiên cứu để xác định chức năng của WRKY nói chung và *NbWRKY79* nói riêng trong các quá trình phát triển ở thực vật.

Sự câm lặng của gene cảm ứng bởi virus (Virus-induced gene silencing-VIGS) là kỹ thuật được sử dụng phổ biến để nghiên cứu chức năng gene ở thực vật, đặc biệt đối với các loài khó tạo thể chuyển gene ổn định. Kỹ thuật VIGS dựa trên cơ chế đề kháng virus thông qua RNA interference (RNAi) ở giai đoạn sau phiên mã ở thực vật. Đối với gene mục tiêu cần phân tích chức năng, một trình tự khoảng 200-800 bp được phân lập và tạo dòng vào vector TRV (Tobacco rattle virus) đã mang gene có nguồn gốc từ virus. Vector tái tổ hợp sau khi được biến nạp vào tế bào thực vật, trình tự gene (trình tự chỉ dẫn) của gene mục tiêu sẽ được khuếch đại cùng với gene của virus và sẽ kích hoạt hệ thống kiểm soát biểu hiện gene sau phiên mã, với vai trò trung tâm của phức hợp gây câm lặng RNAi (RNAi silencing complex-RISC). Dựa trên trình tự chỉ dẫn, phức hợp RISC sẽ dò tìm và phân cắt các RNA được tạo thành từ quá trình phiên mã của gene mục tiêu dẫn đến làm giảm sự biểu hiện ở cấp độ dịch mã của gene mục tiêu. Với sự suy giảm mức độ biểu hiện gene của gene mục tiêu cần phân tích trên cây VIGS khi so sánh với cây đối chứng sẽ cho những nhận định về chức năng của gene [9]. Kỹ thuật VIGS đã được áp dụng để phân tích chức năng của nhiều gene như *Comt*, *pAmt*, và *Kas* ở ớt, *lea4* và *GRX1* ở cây cà chua, *Sall* và *Era1* ở lúa mì [10, 11].

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật VIGS được sử dụng để làm giảm mức độ biểu hiện của gene mã hoá nhân tố phiên mã *NbWRKY79* ở cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*). Những thay đổi trong quá trình phát triển của cây cho thấy vai trò quan trọng của *NbWRKY79* đối với sự phát triển của thực vật.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

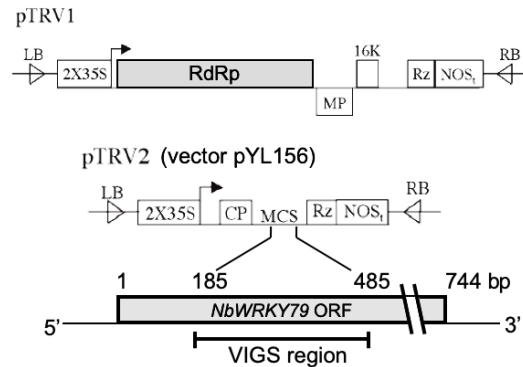
Hạt cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* được ngâm với dung dịch  $KMnO_4$  0.1% trong 30 phút và rửa sạch bằng nước trước khi gieo vào đất. Các chậu trồng cây được đặt trong phòng nuôi cây ở nhiệt độ 28°C, quang kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, cường độ ánh sáng 100  $\mu E/m^2/s$ . Cây được tưới nước hàng ngày và được bón phân sau mỗi tuần. Cây 2 tuần tuổi được sử dụng cho các thí nghiệm VIGS. Xử lý ABA được thực hiện bằng cách phun dung dịch ABA nồng độ 50  $\mu M$  lên lá cây.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Kỹ thuật câm lặng gene cảm ứng bởi virus (VIGS)

Vector VIGS bao gồm *Tobacco rattle virus* plasmid 1 (pTRV1; pYL192) và pTRV2 (pYL156) được sử dụng cho nghiên cứu chức năng gene bằng kỹ thuật VIGS theo mô tả của Liu et al. (2002) [12]. Để tạo vector pTRV2-NbWRKY79, một phân đoạn 300 bp của gene *NbWRKY79* cây thuốc lá được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi NbWRKY79-VIGS chứa trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn EcoRI đầu 5' của mồi xuôi và BamHI đầu 3' của mồi ngược (Hình 1). Sản phẩm PCR được cắt đồng thời với enzyme EcoRI và BamHI và được tạo dòng vào vector pTRV2 được cắt cũng bởi hỗn hợp 2 enzyme EcoRI và BamHI. Plasmid tái tổ hợp pTRV2-NbWRKY79, plasmid pTRV2 không mang gene và plasmid TRV1 được biến nạp riêng biệt vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 dùng kỹ thuật điện biến nạp trên máy BTX ECM630 (Harvardapparatus, MA, Hoa Kỳ) với điện áp 1.500 voltage. Vi khuẩn mang plasmid được chọn lọc trên môi trường Luria-Bertani (LB) agar chứa 50  $\mu g/mL$  kháng sinh kanamycin. Sự hiện diện của phân đoạn gene *NbWRKY79* trong vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được kiểm chứng bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi *NbWRKY79*. Các chủng vi khuẩn mang vector pTRV1, pTRV2 và pTRV2-NbWRKY79 được tăng sinh riêng biệt trên môi trường LB lỏng chứa 50  $\mu g/mL$  kháng sinh kanamycin ở nhiệt độ 28°C trong 18 giờ. Sinh khối các chủng vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm ở tốc độ 8.000 rpm trong 2 phút ở nhiệt độ phòng và được tái huyền phù vào dung dịch đệm 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) pH 5,0 có nồng độ 10 mM, chứa 10 mM  $MgCl_2$  và 200  $\mu M$  acetosyringone, đến  $OD_{600nm}$  bằng 2, để kích hoạt hệ gene *vir* trên các plasmid pTRV. Sau 3 giờ ở nhiệt độ phòng, dung dịch vi

khuẩn chứa plasmid pTRV1 và pTRV2-NbWRKY79 hoặc pTRV1 và pTRV2 được phối trộn theo tỉ lệ cân bằng và được tiêm nhiễm vào mặt dưới của lá cây thuốc lá 2 tuần tuổi bằng ống tiêm syringe 1mL không dùng kim tiêm [12, 13]. Cây thuốc lá sau tiêm nhiễm vi khuẩn được đậy bằng túi nilon để giữ ẩm và đặt ở phòng sinh trưởng có nhiệt độ 28°C, quang kỳ 16 giờ sáng:4 giờ tối, cường độ ánh sáng 5000 lux. Sau 3 tuần, cây VIGS được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Cấu trúc vector VIGS pTRV1 và pTRV2-NbWRKY79 sử dụng trong nghiên cứu. Phân đoạn 300 bp của gene *NbWRKY79* được tạo dòng vào vector pTRV2 tại vị trí cắt bởi EcoRI và BamHI

### 2.2.2 Phân tích biểu hiện gene *NbWRKY79* bằng kỹ thuật RT-PCR và realtime PCR

RNA tổng số từ mô lá của cây thuốc lá VIGS và cây thuốc lá đối chứng được tách chiết dùng bộ kit GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất và tiếp tục xử lý bằng enzyme DNase I (Promega, Hoa Kỳ) để loại bỏ hoàn toàn DNA. Nồng độ RNA tổng số thu nhận được xác định bằng máy quang phổ Biophotometer Plus (Eppendorf, Hoa Kỳ) với  $\mu$ Cuvette™ G1.0 (Eppendorf, Hoa Kỳ). Mẫu RNA tổng số có nồng độ khoảng 2  $\mu$ g/ $\mu$ L, với  $OD_{260/280}$  và  $OD_{260/230} > 2$  được phiên mã ngược thành cDNA dùng bộ kit Maxima Reverse Transcriptases (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* được phân tích bằng phương pháp PCR bán định lượng trên máy Eppendorf Mastercycler nexus (Eppendorf, Hoa Kỳ) với chu kỳ nhiệt theo trình tự: biến tính mạch ban đầu ở 94°C trong 90 giây phút; lặp lại 30 chu kỳ nhiệt (94°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây); hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C trong 10 phút. Tổng thể tích của phản ứng PCR là 20  $\mu$ L chứa 2  $\mu$ L cDNA (nồng độ 100 ng/ $\mu$ L) và 4  $\mu$ L cho mỗi xuôi và mỗi ngược của gene *NbWRKY79* có nồng độ 1  $\mu$ M. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose nồng độ 1,5%. Gene *NbEF1- $\alpha$*  (*Nicotiana benthamiana* Elongation factor 1) được sử dụng làm gene nội kiểm hàm lượng RNA cân bằng ở các mẫu nghiên cứu (Bảng 1).

Định lượng sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* được thực hiện bằng kỹ thuật realtime-PCR định lượng (quantitative realtime-PCR) trên hệ thống LightCycler® 96 System (F. Hoffmann-La Roche, Đức). Tổng thể tích của mỗi phản ứng realtime PCR định lượng là 20  $\mu$ L, bao gồm Maxima SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), khuôn cDNA và một cặp primer được thiết kế đặc hiệu với nồng độ sau cùng là 0,4  $\mu$ M (Bảng 1). Chu trình chạy phản ứng bao gồm 10 phút ở 95°C, 40 chu kỳ gồm 95°C (15 giây) và 60°C (1 phút). Mức biểu hiện tương đối được chuẩn hóa bằng cách sử dụng gene *NbEF1- $\alpha$*  làm gene nội kiểm. Để kiểm tra sản phẩm được khuếch đại, phân tích đường cong nóng chảy (melting curves analysis) được thực hiện ở điều kiện 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút và 95°C trong 15 giây. Tương quan biểu hiện gene giữa các nghiệm thức so với đối chứng được xác định bằng phương pháp  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  theo mô tả của Livak (2001) [14].

Bảng 1: Trình tự nucleotide các mẫu sử dụng trong nghiên cứu

Tên mẫu	Trình tự mẫu xuôi (5'-3')	Trình tự mẫu ngược (5'-3')	Nguồn
<i>NbWRKY79-RT PCR</i>	CTCCTAACGGTTCAGATGATGG	GATGCAGAGGATGTTCTGTCC	[8]
<i>Coat protein</i>	GTTCAGGCGTTCTTGTGTGTC	TTACCGATCAATCAAGATCAG	[8]
<i>NbEF1-<math>\alpha</math></i>	TGTCCCCATCTCTGGTTTCG	AATCTGGTCAAGAGCCTCAAGAA	[8]
<i>NbWRKY79-realtime PCR</i>	GGGCAGAAACATGTAAAAG	CACAATTTCTGTTATCTG	Nghiên cứu này

### 2.2.3 Nhuộm *in situ* ROS

Sự tích tụ ROS bao gồm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và O<sub>2</sub><sup>-</sup> trên lá cây thuốc lá sau xử lý ABA được nhuộm tương ứng bằng dung dịch 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma, MI, Hoa Kỳ) (pH3,8) có nồng độ 1 mg/mL và nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma, MI, Hoa Kỳ) có nồng độ 0,5 mg/mL pha trong đệm potassium phosphate 10 mM (pH 7,8) bổ sung 10 mM NaN<sub>3</sub>. Quy trình nhuộm được thực hiện theo phương pháp của Thordal-Christensen et al. (1997) [15]. Lá cây sau khi nhuộm *in situ* được tẩy màu bằng ngâm trong cồn sôi trong 5 phút.

Sự tích tụ ROS trong tế bào khí khổng được xác định bằng nhuộm lá cây thuốc lá trong dung dịch 5-(6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub> DCF-DA) (Invitrogen, Hoa Kỳ) nồng độ 10 μM trong 15 phút. Tín hiệu huỳnh quang do sự tích tụ của ROS trong tế bào khí khổng được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang Olympus 53X (Olympus, Nhật Bản) với bộ lọc huỳnh quang xanh lục tại bước sóng 500-530 nm. Ảnh huỳnh quang được chụp bằng camera Olympus DP73 (Olympus, Nhật Bản).

### 2.2.4. Xác định hàm lượng chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll trong lá được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Li et al. (2018) [16] với một vài điều chỉnh. Lá tươi được nghiền thành bột mịn trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ. Chlorophyll từ 0,1 g bột mô lá được chiết ngay với 1 ml dung dịch acetone 80% lạnh. Dịch nổi, thu nhận sau ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút, được xác định độ hấp thụ ở bước sóng 665nm và 649nm để tính toán hàm lượng chlorophyll.

### 2.2.5. Nuôi cấy mô *in vitro*

Sự tái sinh cơ quan trong nuôi cấy *in vitro* từ mảnh mô lá ảnh hưởng bởi VIGS được thực hiện như mô tả bởi Anand et al (2007) [17] và Lee et al. (2011) [18]. Các lá phía trên từ cây thuốc lá 6 tuần tuổi với các lá bên dưới đã được tiêm nhiễm VIGS được thu nhận và khử trùng bằng dung dịch NaOCl 5% có bổ sung vài giọt Tween-20 trong 5 phút. Sau khử trùng, lá được tráng bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút. Lá vô trùng được cắt thành những mảnh nhỏ 1 cm<sup>2</sup> và được nuôi cấy trên môi trường MS (Duchefa Biochemie, Haarlem, Hà Lan) bổ sung 3% đường sucrose, 0,8% agar và chất điều hoà sinh trưởng, gồm 0,1 μg/ml 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 μg/ml 6-benzylaminopurine (BA), ở pH 5,9 và nhiệt độ 25°C.

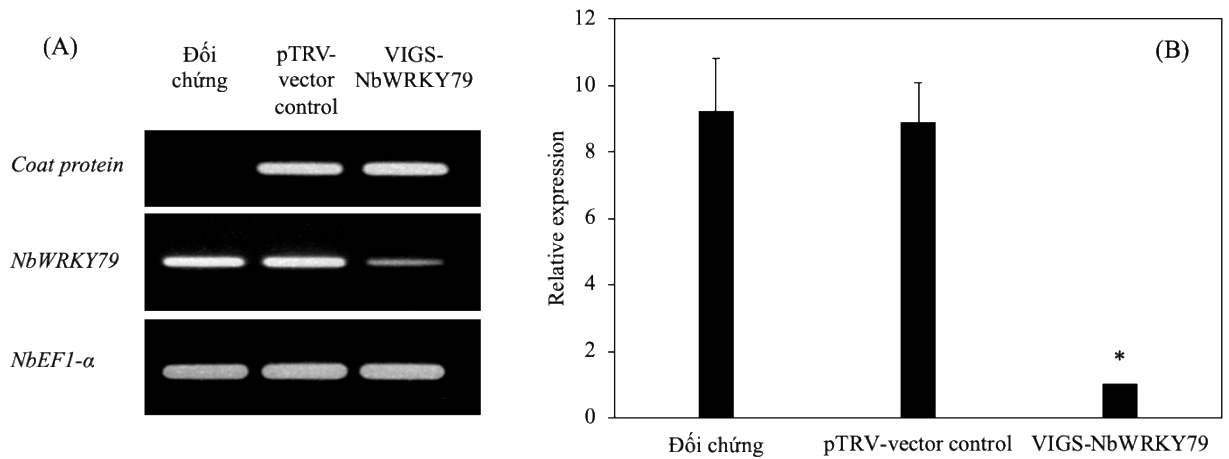
### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các nghiên cứu được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả trình bày là trung bình cộng ± SD. Số liệu nghiên cứu được xử lý so sánh bằng phần mềm kê SPSS Statistics 20 (IBM, Hoa Kỳ) với giá trị *P*-value ≤ 0,05.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 VIGS-NbWRKY79 làm giảm sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* ở cây thuốc lá

Sau 3 tuần được tiêm nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa vector VIGS-*NbWRKY79*, lá non mới hình thành ở phía trên, tại vị trí cách lá được tiêm nhiễm 2 lá, được thu nhận và tách chiết RNA để kiểm tra sự biểu hiện của gene *NbWRKY79*. Hình 2A cho thấy có sự hiện diện của gene *coat protein* (*CP*) mã hoá protein tạo vỏ virus hiện diện ở cả cây VIGS và cây tiêm nhiễm bởi vi khuẩn mang vector pTRV không chứa gene (pTRV-vector control). Gene *CP* là gene thiết kế sẵn trên vector pTRV2 nằm ở vị trí phía trước gene mục tiêu. Kết quả này chứng tỏ vector VIGS đã được tạo dòng thành công vào cây thuốc lá. Hơn nữa, kết quả điện di sản phẩm PCR ở Hình 2B cho thấy sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* ở cây VIGS giảm rõ rệt so với cây đối chứng và cây tiêm nhiễm vi khuẩn chứa vector pTRV2 không mang gene. Phân tích realtime PCR cho thấy tương quan biểu hiện của gene *NbWRKY79* ở cây VIGS chỉ bằng khoảng 11% so với cây đối chứng và cây pTRV-vector control.

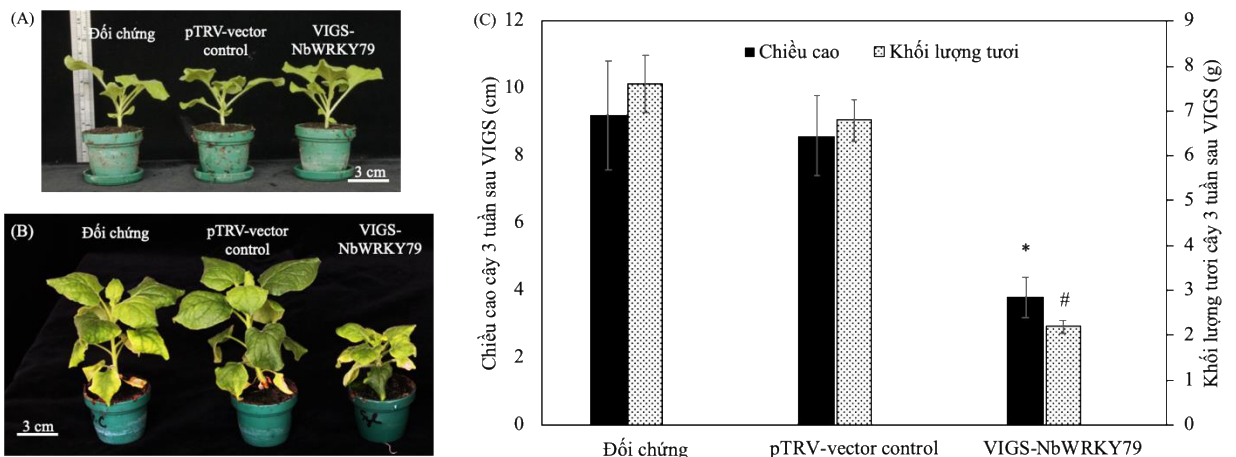


Hình 2: Kết quả phân tích sự biểu hiện của gene *NbWRKY79* của cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. (A) Điện di sản phẩm PCR gene coat protein và *NbWRKY79*. Gene *NbEF1-α* đóng vai trò là gene nội kiểm hàm lượng RNA cân bằng ở các mẫu phân tích. (B) Tương quan biểu hiện của gene *NbWRKY79* giữa cây VIGS-WRKY79 so với cây đối chứng và cây pTRV-vector control. (\*) Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p\text{-value} \leq 0,05$

Mức độ sự suy giảm biểu hiện gene dưới tác động của VIGS thay đổi tùy thuộc vào loài và cơ quan của thực vật. Mức giảm 34% của biểu hiện gene kiểm soát quá trình phát triển rễ bởi VIGS đã được ghi nhận ở cây thuốc lá [19]. Ngoài ra, sự suy giảm biểu hiện gene bởi VIGS lên đến hơn 50% và kéo dài hơn 2 năm được ghi nhận ở cây thuốc lá và cây cà chua [20]. Trong nghiên cứu này, biểu hiện của gene *NbWRKY79* đã giảm hơn 80% so với đối chứng ở lá cây chỉ 3 tuần sau VIGS.

### 3.2 Sự giảm biểu hiện của *NbWRKY* ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây

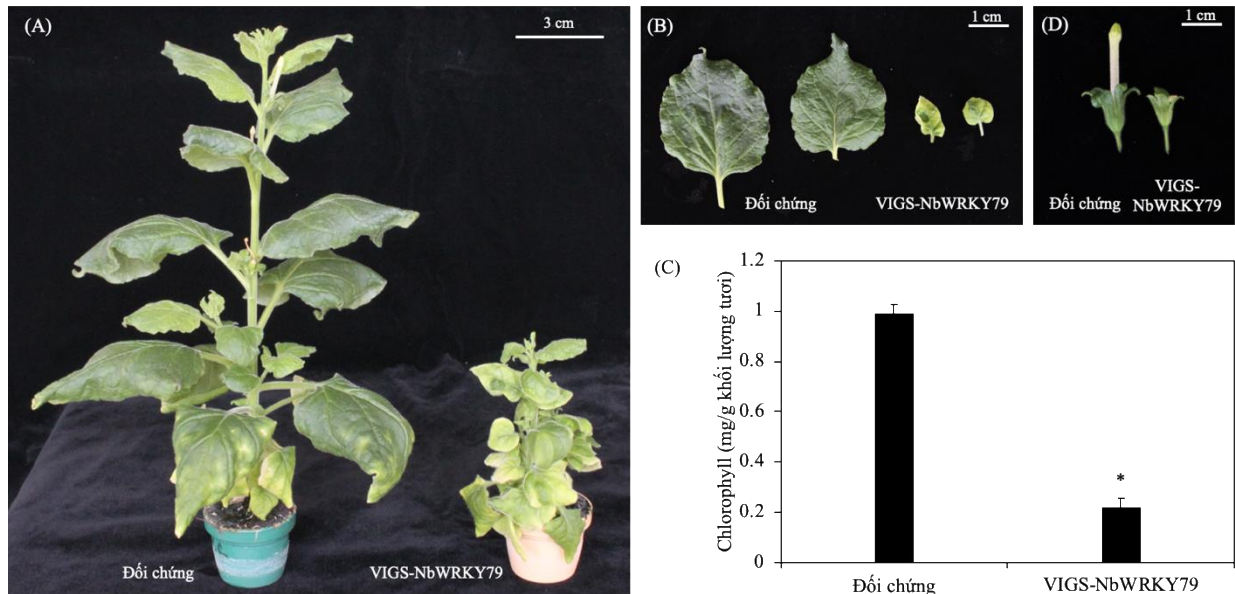
Sau 3 tuần được tiêm nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector VIGS-NbWRKY79, sự sinh trưởng của cây VIGS-NbWRKY79 chậm hơn rõ rệt so với cây đối chứng và cây pTRV-vector control. Không có sự khác biệt giữa cây đối chứng và cây pTRV-vector control, chứng tỏ sự tiêm nhiễm vector pTRV không mang gene không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây (Hình 3A, B). Ngược lại, chiều cao của cây VIGS thấp hơn gần 50% và khối lượng tươi thấp hơn 70% so với cây đối chứng và cây pTRV-vector control (Hình 3C).



Hình 3: Ảnh hưởng của sự giảm biểu hiện gene *NbWRKY79* đến sinh trưởng của cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. (A) Cây thuốc lá 2 tuần tuổi trước khi thực hiện VIGS. (B) Cây thuốc lá sau 3 tuần thực hiện VIGS. (C) Chiều cao và khối lượng tươi của cây sau 3 tuần VIGS. (\*, #) Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p\text{-value} \leq 0,05$

Cây VIGS mặc dù vẫn tiếp tục tạo các lá mới nhưng sự sinh trưởng của lá rất chậm (Hình 4A). Kích thước lá của cây VIGS nhỏ hơn đáng kể so với cây đối chứng (Hình 4B). Lá có hình dạng bất thường với nhiều

phần nhăn cuộn ở phiến lá. Đặc biệt, khi phân tích hàm lượng chlorophyll trong lá cho thấy có sự thấp hơn đáng kể, gần 50%, so với cây đối chứng (Hình 4C). Sự giảm biểu hiện của *NbWRKY79* bởi VIGS còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự phát triển của hoa. Hoa của cây VIGS nhỏ và không phát triển bầu noãn nên các cơ quan hoa như cánh hoa, nhụy đực không phát triển tiếp tục đến trưởng thành và rụng sớm (Hình 4D).



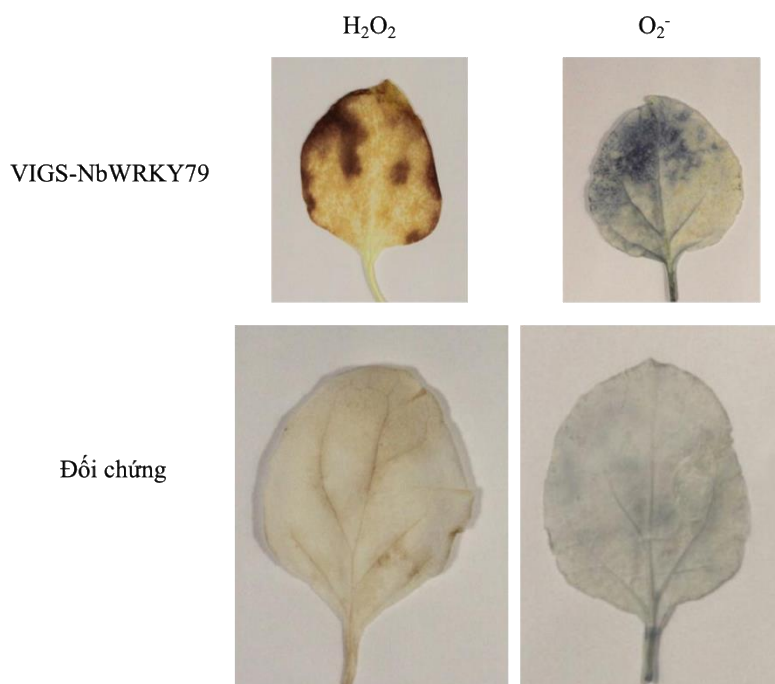
Hình 4: Ảnh hưởng của sự giảm biểu hiện gene *NbWRKY79* đến các cơ quan sinh dưỡng và sinh sản của cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. (A) Cây thuốc lá sau 5 tuần thực hiện VIGS. (B) Lá thứ 1 (bên trái) và thứ 2 (bên phải) tính từ lá được tiêm nhiễm vector pTRV-NbWRKY79 trên cây VIGS và lá tương ứng trên cây đối chứng. (C) So sánh hàm lượng diệp lục tố (chlorophyll) trên cây VIGS và cây đối chứng. Chiều cao và khối lượng tươi của cây sau 3 tuần VIGS. (\*) Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p\text{-value} \leq 0,05$ . (D) Hoa trên cây đối chứng và cây VIGS

Chức năng của các *WRKY* gene trong sự sinh trưởng và phát triển đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu. Cơ chế tác động của *WRKY* rất phức tạp, cả ở dạng tác động dương hoặc âm, tùy thuộc vào quá trình sinh trưởng và phát triển. Có 3 *WRKY* gene ở lúa, *OsWRKY24*, *OsWRKY51* và *OsWRKY71*, được xác định giữ vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng của cây thông qua con đường tín hiệu kiểm soát bởi chất điều hoà sinh trưởng thực vật [21, 22, 23]. Trong đó, *OsWRKY51* và *OsWRKY71* có tác động âm đối với con đường tín hiệu của gibberellin (GA) trong sự sinh tổng hợp enzyme  $\alpha$ -amylase ở lớp aloron hạt lúa. *OsWRKY24* có tác động âm đối với cả con đường tín hiệu của GA và ABA đối với quá trình này. Nghiên cứu của Yu et al. (2016) đã xác định gene *WRKY71* ở *Arabidopsis thaliana* có vai trò quan trọng trong sự ra hoa. Sự ức chế biểu hiện gene *WRKY71* dựa trên kỹ thuật RNAi và đột biến knock-out loại bỏ chức năng gene *WRKY71* đều dẫn đến sự ra hoa chậm ở cây nghiên cứu, đã xác định vai trò hoạt hoá sự ra hoa sớm của *WRKY71* [7]. *WRKY12* và *WRKY13* cũng được chứng minh có vai trò đối ngược trong trung gian điều khiển sự ra hoa bởi GA ở *Arabidopsis thaliana* trong điều kiện ngày ngắn [24]. *WRKY12* có hiệu quả tác động dương trong khi *WRKY13* tác động âm đối với quá trình ra hoa. Trong nghiên cứu của Zhou et al (2016) khi phân tích toàn bộ họ gene *WRKY* ở cây dâu tây đã cho thấy 3 gene *FvWRKY4*, *FvWRKY46* và *FvWRKY48* có tác động dương trong suốt quá trình phát triển của quả. Các *WRKY* khác như *FvWRKY53*, *FvWRKY55* và *FvWRKY70* tác động âm trong quá trình phát triển của lá [25]. Ngoài ra, một phân tích toàn bộ hệ gene khác được thực hiện bởi Sun et al. (2020) ở cây kiều mạch (*Fagopyrum tataricum*) đã xác định có 9 gene liên quan đến sự phát triển của quả [26]. Trong nghiên cứu hiện tại, gene *NbWRKY79*, khi được làm giảm biểu hiện đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây và sự phát triển của hoa, đã cho thấy vai trò của nó trong sự sinh trưởng và phát triển.

### 3.3 VIGS-NbWRKY79 làm gia tăng sự sản sinh ROS ở lá

Gốc tự do oxy hoá ROS gia tăng sản sinh khi cây đáp ứng với các tín hiệu stress từ môi trường hoặc các khiếm khuyết trong quá trình phát triển. Gốc tự do oxy hoá như  $\text{H}_2\text{O}_2$  và  $\text{O}_2^-$  sản sinh trong lá cây thuốc lá

*Nicotiana benthamiana* được nhuộm *in situ* lần lượt bằng DAB và NBT. DAB bị oxy hoá bởi  $H_2O_2$  tạo sản phẩm có màu nâu tối [15]. NBT bị khử bởi  $O_2^-$  tạo sản phẩm formazan xanh lục [27].



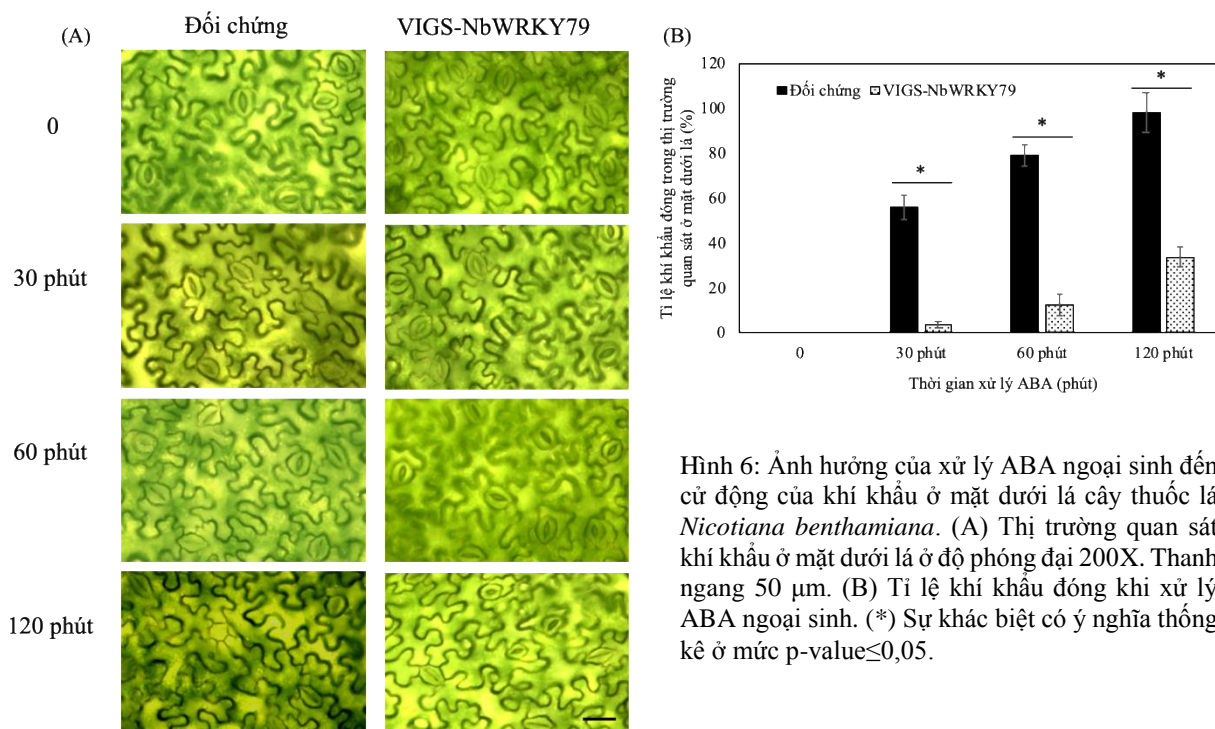
Hình 5: Sự tích tụ ROS ở lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* đối chứng và cây VIGS-NbWRKY79.  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  được xác định bằng nhuộm *in situ* với DAB và NBT.

Kết quả nhuộm *in situ* trình bày trong Hình 5 cho thấy có sự tích tụ đáng kể ROS ở lá của cây VIGS-*NbWRKY79* so với cây đối chứng. Màu nâu hình thành những mảng lớn ở phần lá cây *NbWRKY79* khi nhuộm bằng DAB biểu thị tích tụ của  $H_2O_2$ , tương tự là những mảng xanh đen ở cả phần và gân lá biểu thị sự tích tụ của  $O_2^-$ . Ở lá cây đối chứng, ROS tích tụ rất ít. Một vài WRKY như *GhWRKY41* ở cây bông vải [28], *SpWRKY1* ở cây cà chua [29], cũng như *AtWRKY30* ở *Arabidopsis thaliana* [30] được chứng minh có vai trò quan trọng trong điều hoà hàm lượng ROS trong tế bào. Biểu hiện vượt mức của *GhWRKY41* trên cây thuốc lá đã giới hạn sự tích tụ của ROS trong cây trong điều kiện stress, có nguyên nhân là do sự cảm ứng hàng loạt các enzyme kháng oxy hoá như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) giúp loại bỏ ROS. Cơ chế tương tự cũng được nhận thấy đối với vai trò của *SpWRKY1* và *AtWRKY30* trong kiểm soát hàm lượng ROS. Như vậy có thể thấy sự suy giảm biểu hiện của *NbWRKY79* trong nghiên cứu này, gây nên sự phát triển bất bình thường của lá, dẫn đến rối loạn sự cân bằng sinh tổng hợp ROS. Kết quả này xác nhận vai trò của *NbWRKY79* trong sự kiểm soát lượng ROS sản sinh trong cây thuốc lá.

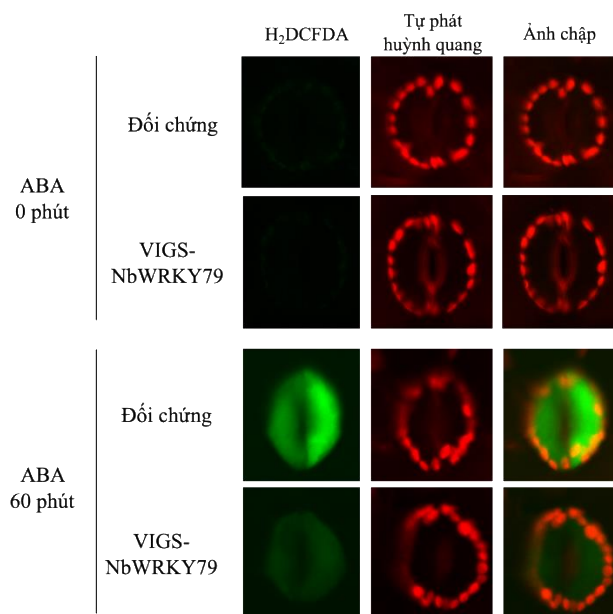
### 3.4 Sự giảm biểu hiện của *NbWRKY79* ảnh hưởng đến chức năng của thực vật được kiểm soát bởi con đường tín hiệu ABA

*NbWRKY79* được chứng minh giữ vai trò quan trọng trong con đường tín hiệu ABA trong đáp ứng với tác động của stress môi trường ở thực vật. Xử lý ABA ngoại sinh làm gia tăng sự biểu hiện của *NbWRKY79* [8]. Để xác định có hay không sự suy giảm biểu hiện của *NbWRKY79* cũng làm giảm chức năng ở thực vật chịu ảnh hưởng của ABA, cây VIGS-*NbWRKY79* được xử lý với ABA trên lá. Cử động của khí khổng được xác định sau khi phun 30 phút, 1 giờ và 2 giờ dưới kính hiển vi quang học (Hình 6A). Sau 30 phút được phun ABA, hơn 50% số lượng khí khổng trong vi trường quan sát ở bề mặt dưới của lá cây đối chứng có biểu hiện đóng, trong khi cây VIGS-*NbWRKY79*, hầu hết các khí khổng đều mở. Ở thời điểm 1 giờ, hơn 70% số lượng khí khổng đóng ở cây đối chứng và chỉ 10% ở cây VIGS-*NbWRKY79*. Sau 2 giờ phun, hầu hết khí khổng trong thị trường quan sát lá cây đối chứng được ghi nhận ở trạng thái đóng, trong khi chỉ khoảng 30% ở cây VIGS-*NbWRKY79* (Hình 6B). Đặc biệt khi tiến hành nhuộm thuốc nhuộm phát huỳnh quang

H<sub>2</sub>DCFDA đối với lá cây đã cho thấy có gia tăng rõ rệt sự tích tụ ROS trong tế bào khí khổng khi xử lý ABA đối với lá cây thuốc lá đối chứng, trong khi ít hơn ở cây VIGS-NbWRKY79 (Hình 7).



Hình 6: Ảnh hưởng của xử lý ABA ngoại sinh đến cử động của khí khổng ở mặt dưới lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. (A) Thị trường quan sát khí khổng ở mặt dưới lá ở độ phóng đại 200X. Thanh ngang 50  $\mu$ m. (B) Tỉ lệ khí khổng đóng khi xử lý ABA ngoại sinh. (\*) Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức p-value  $\leq 0,05$ .



Hình 7: Sự tích tụ ROS ở tế bào khí khổng dưới tác động của ABA. Lá cây được xử lý ABA nồng độ 50  $\mu$ M và nhuộm huỳnh quang CM-H<sub>2</sub>DCFDA nồng độ 10  $\mu$ M trong 15 phút và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 400X.

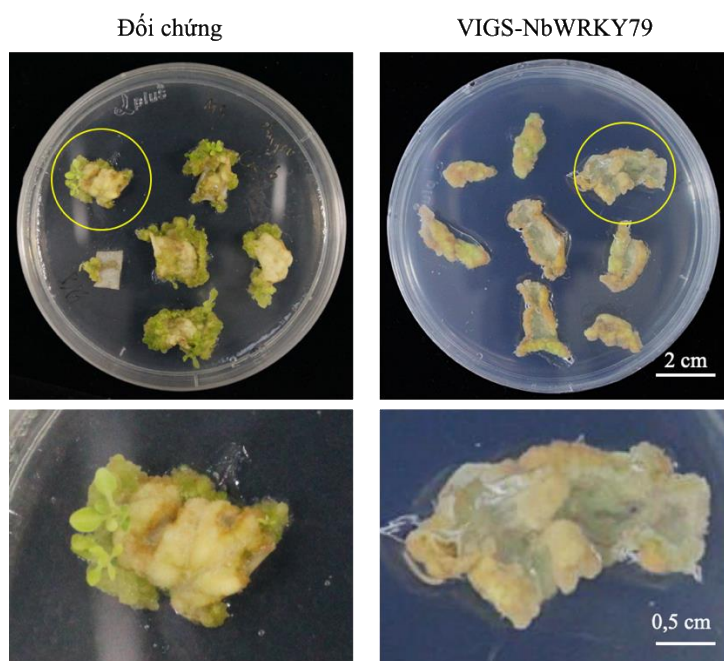
ROS được chứng minh đóng vai trò là tín hiệu thứ cấp trong con đường tín hiệu ABA [31, 32]. Sự gia tăng của ABA kích thích sự sản sinh ROS trong tế bào, và sau đó ROS, ở một nồng độ phù hợp, kích thích sự đóng khí khổng, là cơ chế của thực vật để đáp ứng với các stress của môi trường [33, 34]. Trong nghiên cứu



này, sự suy giảm biểu hiện của *NbWRKY79* có thể ảnh hưởng đến con đường tín hiệu của ABA, dẫn đến sự sản sinh ROS sụt giảm trong tế bào khí khổng. Sự xử lý ABA ngoại sinh, vì vậy, đã không kích thích sự tích tụ ROS trong tế bào khí khổng ở cây VIGS-*NbWRKY79* dẫn đến đóng khí khổng như đã xảy ra ở cây đối chứng.

### 3.5 Vai trò của *NbWRKY79* trong tái sinh cơ quan *in vitro*

Để xác định vai trò của *NbWRKY79* trong sự tái sinh cơ quan *in vitro*, khả năng hình thành chồi dưới tác động của chất điều hoà sinh trưởng thực vật được phân tích. Mảnh lá của cây đối chứng và cây VIGS-*NbWRKY79* được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng tạo chồi chứa cytokinin và auxin. Sau bốn tuần nuôi cấy *in vitro*, sự tái sinh chồi từ mảnh mô lá được đánh giá. Hiệu suất tạo chồi từ mảnh lá cây đối chứng đạt hơn 90%, trong khi đó, hiệu suất này là 0% ở cây VIGS-*NbWRKY79*. Mô sẹo hình thành ở rìa các mảnh lá nuôi cấy của cây đối chứng sau đó tái sinh thành chồi. Ngược lại, đối với mảnh lá từ cây VIGS-*NbWRKY79*, mô sẹo cũng hình thành nhưng lại không có khả năng tái sinh chồi (Hình 8).



Hình 8: Sự tái sinh chồi từ mảnh mô lá cây thuộc lá *Nicotiana benthamiana* nuôi cấy *in vitro*. Ảnh dưới: phóng lớn mảnh mô nuôi cấy trong đĩa Petri cho thấy chồi tái sinh từ mô sẹo ở rìa mảnh mô lá cây đối chứng và mô sẹo không tái sinh chồi ở mảnh mô cây VIGS-*NbWRKY79*.

Nghiên cứu của Gou et al. (2015) đã cho thấy gene *AtWRKY71* điều khiển quá trình hình thành chồi ở *Arabidopsis thaliana*. Sự suy giảm hoạt động của *AtWRKY71* đã làm giảm sự phát sinh chồi [35]. Trong nhiều nghiên cứu khác, WRKY được chứng minh đóng vai trò là yếu tố kết nối giữa các chất điều hoà sinh trưởng thực vật và các quá trình sinh trưởng ở thực vật (sự nảy mầm của hạt, sự phát triển của cây con sau nảy mầm, sự phát triển hoa, sự đóng mở khí khổng) mà chúng kiểm soát [36, 37, 38, 39]. Trong nghiên cứu này, từ kết quả nuôi cấy *in vitro* cho thấy *NbWRKY79* có thể giữ vai trò thiết yếu đối với sự tái sinh cơ quan dưới tác dụng kích thích của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

## 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật làm câm lặng gene cảm ứng bởi virus (VIGS), vai trò của *NbWRKY71* trong sự sinh trưởng của cây, sự phát triển của hoa, sự tái sinh cơ quan *in vitro* cũng như sự liên quan của *NbWRKY79* trong các chức năng sống của thực vật, bao gồm sự sinh tổng hợp ROS, sự đóng mở khí khổng cảm ứng bởi ABA, đã được xác định. Kết quả của nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ hơn nữa chức năng của nhóm gene này không chỉ trong đáp ứng với các tác nhân stress như rất nhiều các nghiên cứu đã thực hiện trước đây mà còn trong quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.J. Rushton, I.E. Somssich, P. Ringler, Q.J. Shen, WRKY transcription factors, *Trends in Plant Science*, vol. 15, no. 5, pp. 247-258, 2010
- [2] T. Eulgem, P.J. Rushton, S. Robatzek, I.E. Somssich, The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 5, pp. 199-206, 2000
- [3] L. Chen, Y. Song, S. Li, L. Zhang, C. Zou, D. Yu, The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta, Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1819, no. 2, pp. 120-128, 2012
- [4] Y. Hu, Q. Dong, and D. Yu, Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*, *Plant Science*, vol. 185-186, pp. 288-297, 2012.
- [5] Z. Tao, H. Liu, D. Qiu et al., "A pair of allelic WRKY genes play opposite roles in rice-bacteria interactions, *Plant Physiology*, vol. 151, no. 2, pp. 936-948, 2009.
- [6] T. Wei, B. Ou, J. Li et al., Transcriptional profiling of rice early response to *Magnaporthe oryzae* identified OsWRKYs as important regulators in rice blast resistance, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [7] Y. Yu, Z. Liu, L. Wang, F. Xiang, WRKY71 accelerates flowering via the direct activation of FLOWERING LOCUS T and LEAFY in *Arabidopsis thaliana*. *Plant journal*, vol. 85, no. 1, pp. 96-106, 2016
- [8] Trinh Ngoc Nam, Le Hong Thia, Dam Sao Mai, Nguyen Vuong Tuan, Overexpression of *NbWRKY79* enhances salt stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 39, pp 121-136, 2017
- [9] A. Becker, M. Lange, VIGS – genomics goes, functional, *Trends in Plant Science*, vol.15, no.1, pp. 1-4, 2010
- [10] P. Xu, Y. Zhang, L. Kang, M.J. Roossinck, K.S. Mysore, Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants, *Plant Physiology*, vol. 142, no. 2, pp. 429-440, 2006
- [11] M.R. Abraham-Juárez, M.C. Rocha-Granados, M.G. López, R.F. Rivera-Bustamante, N. Ochoa-Alejo, Virus-induced silencing of Comt, pAmt and Kas genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits, *Planta*, vol. 227, no. 3, pp. 681-695, 2008
- [12] H. Liu, B. Reavy, M. Swanson, S.A. MacFarlane, Functional Replacement of the Tobacco rattle virus Cysteine-rich Protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses, *Virology*, vol. 298, no. 2, pp. 232-239, 2002
- [13] M. Kim, J.H. Lim, C.S. Ahn, K. Park, G.T. Kim, W.T. Kim, H.S. Pai, Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell*, vol. 18, no. 9, pp. 2341–2355, 2006
- [14] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408, 2001
- [15] H. Thordal-Christensen, Z. Zhang, Y. Wei, D.B. Collinge, Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant journal*, vol. 11, no. 6, pp. 1187-1194, 1997
- [16] Y. Li, C. Liu, J. Zhang, H. Yao, L. Xu, Q. Wang, S. Lawren, Variation in leaf chlorophyll concentration from tropical to cold-temperate forests: association with gross primary productivity, *Ecological Indicators*, vol. 85, pp. 383-389, 2018

- [17] A. Anand, Z. Vaghchhipawala, C.M. Ryu, L. Kang, K. Wang, O. del-Pozo, G.B. Martin, K.S. Mysore, Identification and characterization of plant genes involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation by virus-induced gene silencing, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20, no. 1, pp. 41–52, 2007
- [18] W.S. Lee, S.F. Fu, J. Verchot-Lubicz, J.P. Carr, Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid-induced resistance to potato virus X. *BMC Plant Biology*, vol. 11, no. 41, pp. 1-10, 2011
- [19] T. Valentine, J. Shaw, V.C. Blok, M.S. Phillips, K.J. Oparika, C. Lacomme, Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector, *Plant Physiology*, vol. 136, no. 4, pp. 3999-4009, 2004
- [20] M. Senthil-Kumar, K.S. Mysore, Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology journal*, vol. 9, no. 7, pp. 797-806, 2011
- [21] Z.L. Zhang, Z. Xie, X. Zou, J. Casaretto, T.D. Ho, Q.J. Shen, A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells, *Plant Physiology*, vol. 134, no. 4, pp. 1500-1513, 2004
- [22] Z. Xie, Z.L. Zhang, X. Zou, G. Yang, S. Komatsu, Q.J. Shen, Interactions of two abscisic-acid induced *WRKY* genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells, *The Plant journal*, vol. 46, pp. 231-242, 2006
- [23] Z. Zhang, M. Shin, X. Zou, J. Huang, T.D. Ho, Q. Shen, A negative regulator encoded by a rice *WRKY* gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. *Plant Molecular Biology*, vol. 70, pp. 139–151, 2009
- [24] W. Li, H. Wang, D. Yu, *Arabidopsis* *WRKY* transcription factors *WRKY12* and *WRKY13* oppositely regulate flowering under short-day conditions, *Molecular Plant*, vol. 9, no. 11, pp. 1492 - 1503
- [25] H. Zhou, Y. Li, Q. Zhang, S. Ren, Y. Shen, L. Qin, et al. Genome-wide analysis of the expression of *WRKY* family genes in different developmental stages of wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit. *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, pp. e0154312, 2016
- [26] W. Sun, Z. Ma, H. Chen, M. Liu, Genome-wide investigation of *WRKY* transcription factors in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and their potential roles in regulating growth and development. *Peer journal*, vol. 8, pp. e8727, 2020
- [27] K. Ogawa, S. Kanematsu, K. Asada, Generation of superoxide anion and localization of CuZn-Superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: Their association with lignification, *Plant Cell Physiology*, vol. 38, no. 10, pp. 1118-1126, 1997
- [28] X. Chu, C. Wang, X. Chen, W. Lu, H. Li, X. Wang, L. Hao, X. Guo, The cotton *WRKY* Gene *GhWRKY41* positively regulates salt and drought stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, pp. e0143022, 2015
- [29] J.B. Li, Y.S. Luan, Z. Liu. Overexpression of *SpWRKY1* promotes resistance to *Phytophthora nicotianae* and tolerance to salt and drought stress in transgenic tobacco. *Physiologia Plantarum*, vol. 155, no. 3, pp. 248-266, 2015
- [30] M.A. El-Esawi, A.A. Al-Ghamdi, H.M. Ali, M. Ahmad. Overexpression of *AtWRKY30* transcription factor enhances heat and drought stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 2, pp. 163-176, 2019

- [31] S. Neill, R. Barros, J. Bright, R. Desikan, J. Hancock, J. Harrison, Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, pp. 165–176, 2008
- [32] M. Simontacchi, A. Galatro, F. Ramos-Artuso, G.E. Santa-María, Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant Responses to abiotic stress, *Frontiers in Plant Science*, vol. 6, pp. 977-986, 2015
- [33] E. Arc, J. Sechet, F. Corbineau, L. Rajjou, A. Marion-Poll, ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination, *Frontiers in Plant Science*, vol. 4, pp. 63-82, 2013
- [34] S. Agurla, A.S. Raghavendra, Convergence and divergence of signaling events in guard cells during stomatal closure by plant hormones or microbial elicitors, *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, pp. 1332-1341, 2016
- [35] D. Guo, J. Zhang, X. Wang, X. Han, B. Wei, J. Wang, B. Li, H. Yu, Q. Huang, H. Gu, L.J. Qu, G. Qin, The WRKY transcription factor WRKY71/EXB1 controls shoot branching by transcriptionally regulating RAX genes in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, vol. 27, no. 11, pp. 3112–3127, 2015
- [36] Y.J. Jiang, D.Q. Yu, WRKY transcription factors: links between phytohormones and plant processes, *Science China Life Sciences*, vol. 58, pp. 501–502, 2015
- [37] K. Nakashima, Y. Fujita, N. Kanamori, T. Katagiri, T. Umezawa, S. Kidokoro, K. Maruyama, T. Yoshida, K. Ishiyama, M. Kobayashi, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy, *Plant Cell Physiol*, vol. 50, no. 7, pp. 1345 – 1363, 2009
- [38] J. Li, S. Besseau, P. Törönen, N. Sipari, H. Kollist, L. Holm, E.T. Palva, Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, vol. 200, no. 2, pp. 457-472, 2013
- D.L. Rushton, P. Tripathi, R.C. Rabara, J. Lin, P. Ringler, A.K. Boken, T. J. Langum, L. Smidt, D.D. Boomsma, N.J.
- [39] Emme, X. Chen, J.J. Finer, Q.J. Shen, P.J. Rushton, WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology journal*, vol. 10, no. 1, pp. 2-11, 2012

Ngày nhận bài: 14/09/2020

Ngày chấp nhận đăng: 08/01/2021