

## TÁCH ĐOẠN ĐOẠN GEN *Lc* HOẠT HÓA SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN Ở CÂY NGŨ NẾP ĐỊA PHƯƠNG (*ZEA MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)

Phạm Thị Thanh Nhân<sup>1,✉</sup>, Lê Trần Bình<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ptnhansptn@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.6.2016

Ngày nhận đăng: 15.9.2017

### TÓM TẮT

Ngũ nếp (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) là một trong các hạt ngũ cốc phổ biến và quan trọng tại Việt Nam, đặc biệt ở các vùng núi phía bắc. Anthocyanin được coi là một dấu hiệu stress do hạn gây ra và là một phần trong cơ chế hạn chế tác động của stress. Sự biểu hiện của các gen cấu trúc hay các enzyme tham gia vào các phản ứng sinh tổng hợp anthocyanin ở các bộ phận cây ngô rất cần sự có mặt các nhân tố phiên mã thuộc họ Myb, Myc (hay bHLH) và WD40. Các gen thuộc họ Myb điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin ở ngô đã được nghiên cứu nhiều gồm các gen *Cl*, *P1*, *Pl*. Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được nghiên cứu gồm *B*, *R*, *Sn* và *Lc* (Leaf color). Bài báo này phân tích trình tự đoạn gen *Lc* hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin từ giống NH và BS1. Trình tự đoạn gen *Lc* gồm 822 nucleotit mã hóa cho 273 amino acid với 12 vị trí sai khác giữa hai giống. Hai trình tự nucleotide này có sự tương đồng cao với các trình tự trong họ bHLH ở cây ngô (từ 98,9% đến 99,3%). Protein suy diễn của đoạn gen *Lc* thuộc vị trí từ 338- 610 của phân tử protein *Lc* hoàn chỉnh. Có 9 vị trí amino acid thay đổi giữa hai giống NH và BS1, trong đó có hai vị trí amino acid khác nhau (444 và 446) thuộc vùng bHLH của nhân tố phiên mã *Lc*.

**Từ khóa:** Anthocyanin, gen *Lc*, khả năng chịu hạn, ngô nếp địa phương, nhân tố phiên mã

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau lúa của nông dân vùng trung du và miền núi phía Bắc, và là cây lương thực chính của đồng bào các dân tộc thiểu số ở các vùng núi cao (Niên giám thống kê, 2017). Trong những năm gần đây, hướng sản xuất ngô ở nước ta là tăng cường diện tích ngô lai năng suất cao, các giống ngô nếp địa phương cho năng suất thấp ít được quan tâm phát triển, nhiều giống ngô quý hiếm bị mất dần mặc dù chất lượng hạt cao, khả năng chịu hạn tốt và phù hợp với điều kiện canh tác đất dốc của từng vùng ở miền núi. Vì vậy, việc nghiên cứu và chọn tạo các giống ngô có khả năng chịu hạn là việc làm rất cần thiết, góp phần bảo tồn nguồn gen và tạo vật liệu cho lai giống.

Anthocyanin là chất màu thiên nhiên được sử dụng an toàn trong công nghiệp chế biến thực phẩm và dược phẩm. Anthocyanin được tìm thấy trong không bào của tế bào biểu bì, mô mạch dẫn (David *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2007; Hooijmaijers *et al.*, 2007). Anthocyanin được coi là một dấu hiệu stress và là một phần trong cơ chế hạn chế tác động của stress hạn gây ra. Chức năng này là do anthocyanin

có khả năng chuyển hoá ROS (Reactive oxygen species) gấp 4 lần so với vitamin E, C, và làm vô hiệu hoá hầu hết các ROS và các gốc nitrogen quan trọng (Winkel-Shirley, 2002).

Sự biểu hiện của các gen cấu trúc hay các enzyme tham gia vào các phản ứng sinh tổng hợp anthocyanin ở các bộ phận cây ngô rất cần sự có mặt các nhân tố phiên mã thuộc họ Myeloblast (Myb), basic helix-loop-helix (bHLH) hay Myc và WD40 (Gould *et al.*, 2007). Các gen thuộc họ Myb điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin ở ngô đã được nghiên cứu nhiều gồm các gen *Cl* (Colored Aleurone 1), *P1* (Purple), *Pl* (Purple leaf). Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được nghiên cứu gồm *B-Peru*, *R*, *Sn* và *Lc* (Leaf color). Các trình tự gen này trong một họ khá tương đồng với nhau (Radicella *et al.*, 2005). Tùy thuộc vào từng giống ngô mà có thể có một hoặc cả bốn gen này (Szankowski *et al.*, 2007). Các protein này hoạt hóa các gen cấu trúc *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *Bz*, trong đó ba gen *CHS*, *DFR* và *F3H* được coi là gen chìa khóa của quá trình sinh tổng hợp anthocyanin. Sản phẩm gen *Lc* (Leaf color) là 1 loại protein điều hòa tổng hợp các enzyme chuyển hóa tạo ra anthocyanin có màu đỏ trong các

mô gân lá, lõi bẹ, vỏ hạt, lá bắc, mày ngô. Chiều dài đầy đủ của gen *Lc* mã hóa cho 610 axit amin với bốn vùng chức năng theo thứ tự: vùng MIR gồm 252 amino acid (thuộc vị trí từ 1 đến 252, là nơi tương tác với protein MYB để tăng tốc độ phiên mã của các gen cấu trúc), vùng có tính acid gồm 160 amino acid (thuộc vị trí từ 253- 410, thường là nơi tương tác với protein WD40 và PAC1), vùng bHLH gồm 52 amino acid (thuộc vị trí từ 411- 462, là vùng trung tâm hoạt động) và vùng còn lại gồm 76 amino acid (thuộc vị trí từ 463- 610).

Sự gia tăng hàm lượng anthocyanin đã được ghi nhận thông qua sự biểu hiện vượt ngưỡng của gen mã hóa các nhân tố phiên mã *Lc* ở ngô (Heather Ray *et al.*, 2003). Bài báo này phân tích trình tự đoạn gen *Lc* hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng 02 giống ngô nếp địa phương do Viện Nghiên cứu ngô cung cấp: Nà Hạo (kí hiệu NH) và Bán Sơn (kí hiệu BS1).

Vector pBT và chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Các hóa chất Trizol<sup>®</sup> Reagent, Kit tổng hợp cDNA (First Strand cDNA Synthesis), Master mix

PCR, T4 ligase, T4 ligase buffer... được mua từ hãng Invitrogen, Fermentas, Merck.

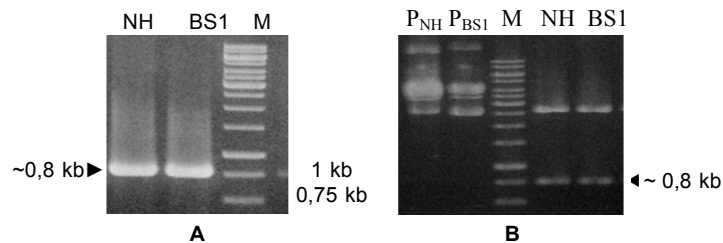
### Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp gây hạn nhân tạo cho các giống ngô địa phương ở giai đoạn cây non theo mô tả của Lê Trần Bình & Lê Thị Muội (1998). Bào đất đảm bảo đủ dinh dưỡng nuôi cây.

Tách chiết và tinh sạch RNA tổng số từ thân cây ngô non bị hạn được thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất Trizol. Tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của Kit Fermentas. Thiết kế mỗi bằng phần mềm DNASTar trên cơ sở trình tự gen *Lc* của ngô đã công bố trên ngân hàng gen (NCBI) với mã số NM- 001111869. Các cặp mồi được tổng hợp tại hãng Invitrogen có trình tự: LcF1: 5'- CGCCGCCGACGCCTCAA- 3', LcR1: 5'- GCTGCCCCCTCACCGCTCC- 3'. Đoạn gen *Lc* cần nhân có kích thước 822bp. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được tiến hành theo chương trình 94°C: 3 min 30s; (94°C: 30s; 60°C: 50s; 72°C: 1 min 20s) lặp lại 30 chu kỳ; 72°C: 10 min; 4°C:  $\infty$ .

Tách dòng đoạn gen *Lc* được tiến hành bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector pBT. Xác định trình tự DNA theo phương pháp của Sanger *et al.*, (1977). Sử dụng phần mềm BioEdit để phân tích trình tự nucleotide.

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng Công nghệ ADN Ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



**Hình 1.** Hình ảnh điện di sản phẩm RT- PCR của đoạn gen *Lc* (A) và kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng *Bam*HI (B) của giống BS1 và NH. M: marker 1kb; P<sub>NH</sub>: plasmid tái tổ hợp giống NH; P<sub>BS1</sub>: plasmid tái tổ hợp giống BS1.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả chọn dòng mang đoạn gen *Lc* từ 2 giống ngô nếp địa phương NH và BS1

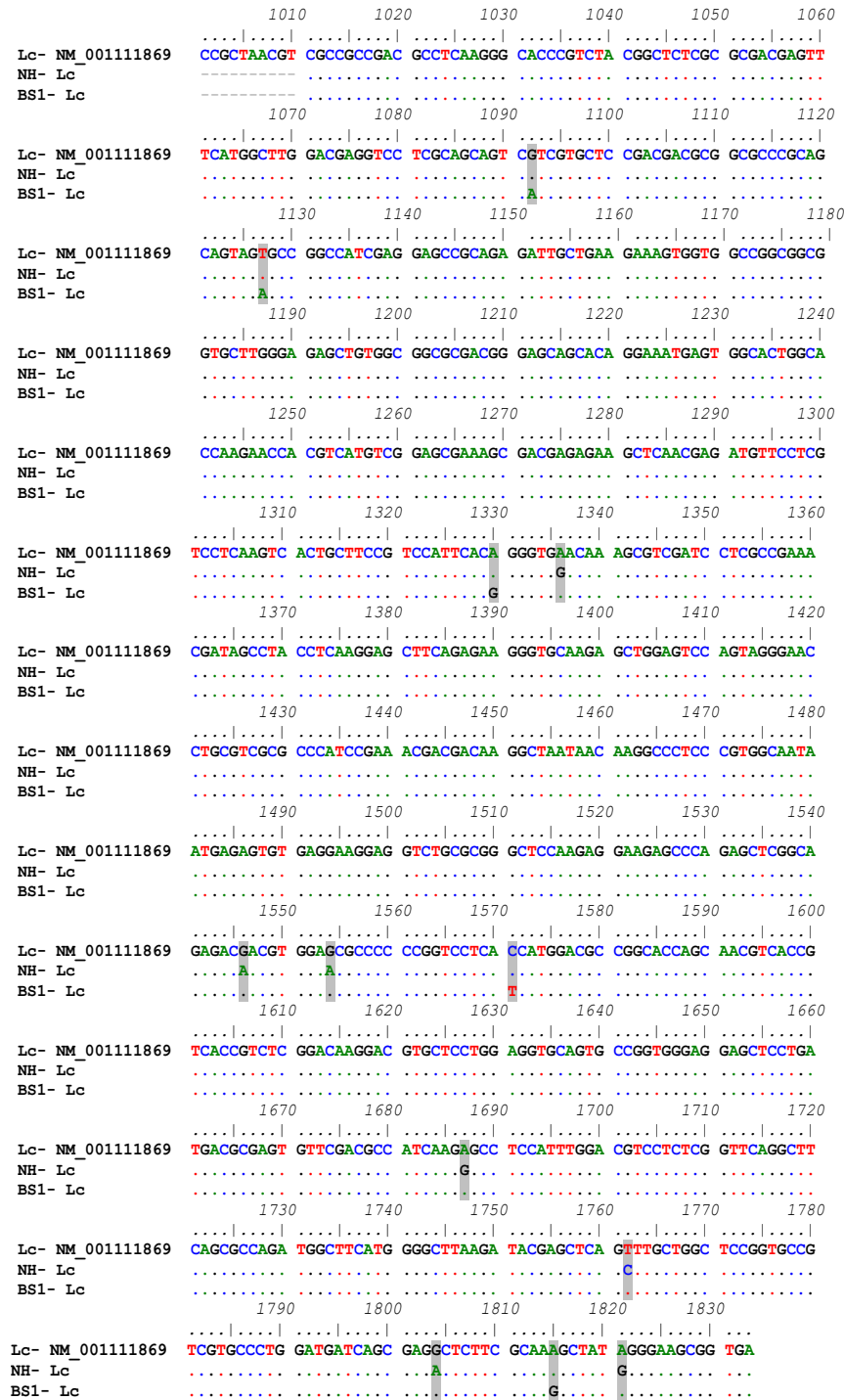
Trên cơ sở kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của 10 giống ngô nếp địa phương, chúng tôi tiến hành phân lập và tạo dòng đoạn gen *Lc* ở hai giống NH (giống có khả năng chịu hạn tốt) và BS1 (giống có khả năng chịu hạn kém) để nghiên cứu sâu hơn về cơ sở phân tử.

RNA tổng số của 2 giống ngô được sử dụng làm

khuôn cho phản ứng RT- PCR với cặp mồi Oligo(dT)18, LcF1 và LcR1 để phát hiện sản phẩm phiên mã của gen *Lc*. Sản phẩm PCR thu được rất đặc hiệu, có kích thước khoảng 0,8 kb (Hình 1A). Sản phẩm PCR của hai giống ngô NH và BS1 được gắn trực tiếp vào vector tách dòng, biến nạp vào chủng *E. coli* và cấy trên môi trường chọn lọc có carbenicillin. Để kiểm tra kích thước thực tế của đoạn cDNA xen vào, các mẫu DNA plasmid thu được được xử lý cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI. Enzyme này sẽ cắt vector tách dòng tại vị trí đầu và cuối của đoạn cDNA

ngoại lai. Kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt cho thấy, đoạn DNA được cắt rời ra khỏi vector tái tổ hợp có kích thước phân tử khoảng 0,8 kb, tương ứng với

kích thước của đoạn gen *Lc* cần tách dòng. Như vậy, dòng plasmid tái tổ hợp của mẫu NH và BS1 có mang sản phẩm PCR đã được chọn lọc (Hình 1B).



Hình 2. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *Lc* ở giống NH và BS1.

**Kết quả xác định trình tự nucleotide của đoạn gen Lc của hai giống ngô nếp NH và BS1**

Trình tự đoạn gen *Lc* của hai giống ngô nếp BS1 và NH được tiến hành xác định theo phương pháp Sanger. Để kiểm tra kết quả, phần mềm sinh học ClustalW được sử dụng để so sánh trình tự gen này với trình tự gen trên Ngân hàng gen quốc tế. Kết quả cho thấy trình tự DNA của gen *Lc* đầy đủ bao gồm cả intron và exon dài 9539 bp, cDNA của gen *Lc* dài 1833 nucleotide và mã hóa cho 610 amino acid. Trình tự cDNA đọc được dài 822 bp là một phần của gen *Lc*, mã hóa cho 273 amino acid (Hình 2). Đoạn peptide suy diễn của trình tự đọc được thuộc vị trí từ 338- 610 của phân tử protein Lc hoàn chỉnh.

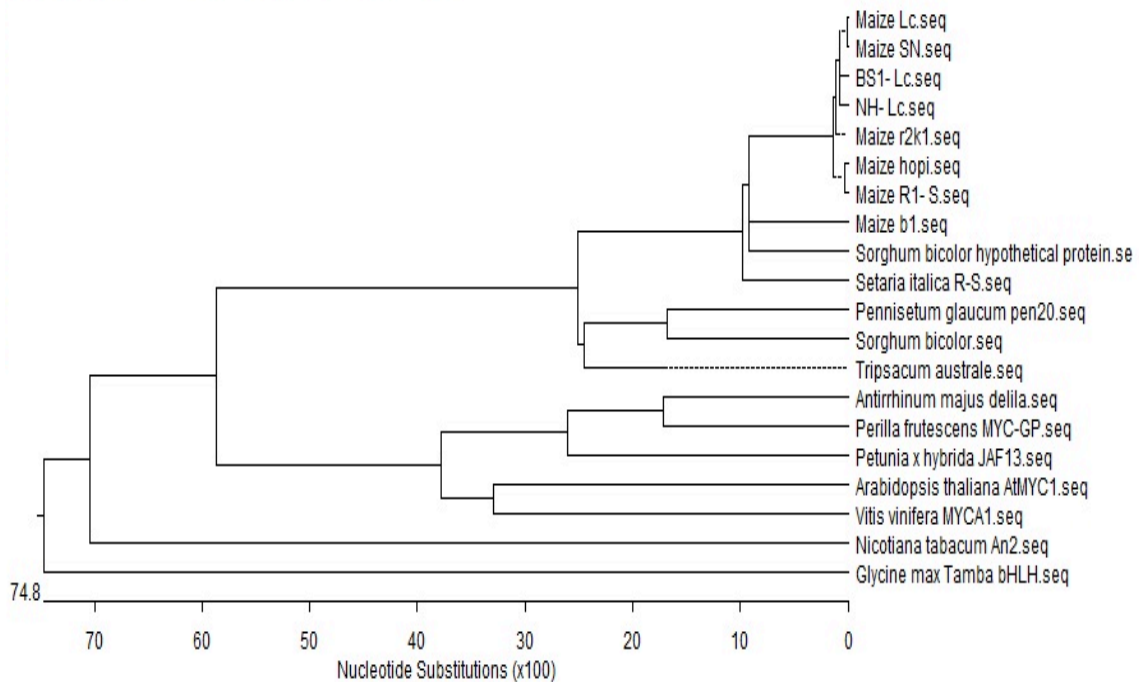
**So sánh trình tự của đoạn gen Lc của hai giống ngô nếp NH và BS1**

Trình tự nucleotide của phân đoạn gen *Lc* ở giống BS1 tương đồng 98% với trình tự DNA của gen *Lc* hoàn chỉnh được đăng kí trên GenBank với mã số DQ414252, và tương đồng 99% với trình tự cDNA

(mã số NM-001111869). Đoạn gen *Lc* được xác định tương đồng với trình tự nucleotide phía cuối của gen *Lc* hoàn chỉnh. So với trình tự được phân lập từ mRNA đã đăng kí trên GenBank (mã số NM\_001111869.1), trình tự đoạn gen *Lc* ở hai giống NH và BS1 khác nhau ở 12 vị trí, thuộc các nucleotide thứ 1092, 1127, 1330, 1336, 1546, 1554, 1571, 1687, 1762, 1804, 1815 và vị trí 1821 (Hình 2).

**Phân tích trình tự tương đồng của đoạn gen Lc của giống NH và BS1 với các gen trong họ bHLH**

Dựa vào các trình tự nucleotide của đoạn gen *Lc* và gen thuộc họ bHLH trong quá trình sinh tổng hợp anthocyanin ở ngô và các đối tượng khác đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế (NCBI), kết quả phân tích trình tự tương đồng được trình bày ở hình 3. Kết quả phân tích trong bảng và hình cho thấy, trình tự nucleotide của đoạn gen *Lc* ở hai giống thu được có sự tương đồng rất cao với trình tự đoạn gen *Lc* và *Sn* đã công bố trên GenBank (từ 98,9% đến 99,3%). Hai trình tự này cũng có tương đồng cao với các trình tự trong họ bHLH ở cây ngô.



Hình 3. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa đoạn gen *Lc* của giống ngô NH và BS1 với các gen thuộc họ bHLH0.

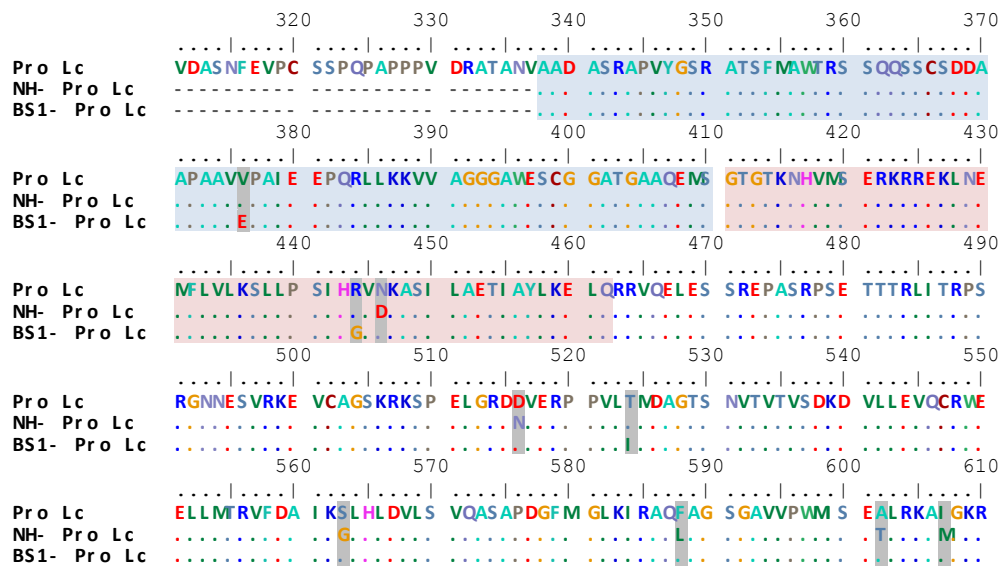
**So sánh cấu trúc của các vùng chức năng của protein Lc**

Sự khác nhau về trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen *Lc* giữa hai giống NH và BS1 được trình

bày ở hình 4. Kết quả cho thấy, trình tự nucleotide của hai giống NH và BS1 khác nhau ở 12 vị trí nhưng chỉ có 9 amino acid khác nhau. Các amino acid giống nhau của NH và BS1 chủ yếu thuộc vùng có tính acid và bHLH của nhân tố phiên mã *Lc*.

Vùng bHLH là đặc trưng của nhóm protein MYC (bHLH) và có tính bảo thủ. Đây chính là vị trí tương tác của protein Lc với DNA để tăng tốc độ phiên mã của các gen cấu trúc mã hóa cho các enzyme tham gia chuyển hóa tổng hợp anthocyanin. Vùng này có hai vị trí amino acid khác nhau (444 và 446). Như vậy, sự thay đổi amino acid của protein này có thể là nguyên nhân làm tăng hàm lượng anthocyanin và tính chịu hạn cho cây ngô (Babu *et al.*, 2004; Noda *et al.*, 2000). Tuy nhiên để khẳng định điều này cần

phải nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và sự biểu hiện của protein trên. Khi nghiên cứu về gen *Lc*, nhóm nghiên cứu tại phòng thí nghiệm Doug Schemske đã khẳng định mối liên quan giữa anthocyanin ở hoa và độ ẩm của đất. Trên đất trồng bị khô, những cây hoa *Linanthus parryae* màu xanh sinh sản ưu thế hơn so với hoa màu trắng. Tương tự ở *L. parviflorus*, cây sống trên “đất đá mềm” cho hoa màu hồng, cây sống trên đất đá cát cho hoa màu trắng (Schemske *et al.*, 2001).



Hình 4. So sánh trình tự amino acid suy diễn của đoạn protein Lc ở giống NH và BS1.

## KẾT LUẬN

Đã tách dòng và xác định trình tự đoạn gen *Lc* từ giống NH và BS1. Trình tự đoạn gen *Lc* 822 bp, mã hóa cho 273 amino acid với 12 vị trí sai khác. Protein suy diễn của đoạn gen *Lc* có 9 vị trí amino acid thay đổi giữa hai giống NH và BS1.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Phòng Công nghệ ADN ứng dụng và Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Babu MM., Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA (2004) Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol* 14 (3): 283- 291.

Batool F, Sabir SM, Rocha JBT, Shah AH, Saify ZS and Ahmed SD (2010) Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: a commonly used spice from Pakistan. *Pak J Bot* 42: 4299-4311.

David R, Kristen Bell, Gochenaur (2006) Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Applied Physiology* 626 (4): 1164- 1170.

Gould KS, Lister C (2007) Flavonoid functions in plants. CRC Press, Boca Raton: 397- 441.

Heather Ray, Min Yu, Patricia Auser, Lauren Blahut Beatty, Brian McKersie, Steve Bowley, Neil Westcott, Bruce Coulman, Alan Lloyd and Margaret Y Gruber (2003) Expression of Anthocyanins and Proanthocyanidins after Transformation of Alfalfa with Maize Lc. *Plant Physiology* 132: 1448-1463.

Hooijmaijers CAM, Gould KS (2007) Photoprotective pigments in red and green gametophytes of two New Zealand liverworts. *New Zeal J Bot* 45: 451-461.

- Noda Y, Kneyuki T, Igarashi K, Mori A and Packer L (2000) Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology* 148: 119-123.
- Radicella JP, Turks D, Chandler VL (2005) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize. *Plant Mol Biol* 17: 127-130.
- Schemske D W, Bierzychudek P (2001) Evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*. *Evolution* 55(1): 1269- 1282.
- Szankowski I, Li H, Flachowsky H, Fischer TC, Hanke MV, Forkmann G, Treutter D, Schwab W, Hoffmann T (2007) Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh). *Planta* 226(5): 1243- 1254.
- Tổng cục thống kê (2017) Niên giám thống kê 2016. Nhà xuất bản Thống kê, Hà Nội.
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5: 218-223.

## **CLONING OF GENE CONTAINING A SEGMENT OF *Lc* REGULATORY GENE IN THE ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS FROM LOCAL STICKY CORN CULTIVARS (*ZEA MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)**

**Pham Thi Thanh Nhan<sup>1</sup>, Le Tran Binh<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>University of Education, Thai Nguyen University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

### **SUMMARY**

Sticky corn (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) is one of the important and widely grown plants in Vietnam, especially in mountainous regions. Anthocyanin is considered as a sign of the stress caused by drought and a part of the drought- tolerant mechanism. The expression of the structural genes or enzymes involved in the anthocyanin biosynthesis in parts of maize plants needs the presence of transcription factors belonging to MYB, Myc (or bHLH) and WD40 family. Genes of MYB family regulating anthocyanin biosynthesis have been studied including *Cl*, *P1*, *Pl*. While genes of Myc family (or bHLH) studied include *B*, *R*, *Sn* and *Lc* (Leaf color). This paper analyzed the sequence of a segment of *Lc* gene which activates anthocyanin biosynthesis from NH and BS1 sticky corn cultivars. The sequences of *Lc* gene segments consist of 822 nucleotides encoding 273 amino acids with differences in 12 positions. They are highly similar to others in maize bHLH family (from 98,9% to 99,3%). The deductive proteins of these two *Lc* gene segments locate from 338 to 610 of the complete *Lc* protein. There are 9 amino acid positions changed between NH and BS1 cultivars, in which there are two different amino acid positions (444 and 446) in the bHLH domain of the *Lc* transcription factor.

**Keywords:** Anthocyanin, *Lc* gene, drought tolerance, local sticky corn, transcription factor