

## TÁCH DÒNG PHẦN TỬ MANG ĐOẠN GEN B HOẠT HÓA SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN Ở CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG (*ZEА MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)

Phạm Thị Thanh Nhân<sup>1</sup>, Lê Hoàng Đức<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Nga<sup>1</sup>, Lê Trần Bình<sup>2,3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

Ngày nhận bài: 21.5.2015

Ngày nhận đăng: 30.12.2015

### TÓM TẮT

Ngô nếp (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) là một trong các hạt ngũ cốc phổ biến tại Việt Nam, đặc biệt quan trọng đối với những người dân sinh sống vùng núi cao, thường bị hạn hán và điều kiện canh tác đất dốc. 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* (Colored Aleurone 1), *Pl* (Purple), *Pl* (Purple leaf). Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được nghiên cứu gồm *B*, *R*, *Sn* và *Lc* (Leaf color). Locus B (hay b1) gồm các alen *B- I*, *B- Peru*, *B-Bolivia*. 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. Bài báo này phân tích trình tự đoạn gen *B* hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin. Đã tách dòng và xác định được trình tự đoạn gen *B* từ giống NH và BS1. Trình tự đoạn gen *B* gồm 801 nucleotide mã hóa cho 267 amino acid. Protein suy diễn của đoạn gen *B* có 9 vị trí amino acid thay đổi giữa hai giống NH và BS1 so với trình tự gen *b1* trên GenBank. Trình tự nucleotide của gen *B* ở hai giống thu được có sự tương đồng cao với trình tự gen *b1*, *B1* và *B- Peru* (98,8%, 99,1% và 98,8%).

**Từ khóa:** Anthocyanin, gen B, khả năng chịu hạn, Myc, ngô nếp địa phương

### MỞ ĐẦU

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, 2013). 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 với màu

đỏ, đỏ tía, tím và xanh đậm (David *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2006; 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 mã hóa các enzyme tham gia vào chuỗi phản ứng sinh tổng hợp anthocyanin ở cây ngô rất cần sự có mặt của các nhân tố phiên mã thuộc họ Myeloblastosis (Myb), basic helix-loop-helix (bHLH) hay Myc và WD40 (Gould *et al.*, 2008). Giới thực vật có khoảng hơn 100 gen Myb, và Myc (Springob, 2003). 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), *Pl* (Purple), *Pl* (Purple leaf). Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được

ngiên cứu gồm *B* (Booster), *R* (Red color), *Sn* (Scutellar node) và *Lc* (Leaf color). Các trình tự gen này trong một họ khá tương đồng với nhau (Radicella *et al.*, 2005). Gen *B* nằm trên NST số 2 (2S), gen *R* nằm trên NST số 10 (10L), gen *Lc* và *Sn* cùng nằm trên NST số 10 (cách locus *R* ~ 2cM). Locus *B* (hay *b1*) gồm các alen *B- I*, *B- Peru*, *B-Bolivia*. Tùy thuộc vào từng giống ngô mà có thể có một hoặc cả bốn gen này (Szankowski *et al.*). Các protein trong họ này cũng được tìm thấy trong *Arabidopsis thaliana* (AtTT8), *Oryza sativa* (OsRa-c) (Castellarin *et al.*). 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.

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 *B* ở ngô (Selma *et al.*, 2008). Bài báo này phân tích trình tự đoạn gen *B* hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Chúng tôi sử dụng 2 giống ngô nếp địa phương do Viện Nghiên cứu ngô Đan Phượng- Hà Nội cung cấp.

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 Kit Trizol, Kit tổng hợp cDNA, Master mix PCR, T4 ligase, T4 ligase buffer... được mua từ hãng Invitrogen, Fermatas, Merck.

### Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết và tinh sạch RNA tổng số từ thân cây ngô non bị hạn được thực hiện theo hướng dẫn của Kit Trizol. Tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của Kit Fermatas. Thiết kế mỗi bằng phần mềm DNASTAR trên cơ sở trình tự gen *b1* của ngô đã công bố trên ngân hàng gen (NCBI) với mã số NM- 001112236. Các cặp mồi được tổng hợp tại hãng Invitrogen có trình tự: BF1: 5'-AGCCGCGAGGAGCATCAACTG- 3', BR1: 5'-TAGCGGCTGCACGTCCATTTCTC- 3'. Đoạn gen *B* cần nhân có kích thước 801bp. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được tiến hành theo chương trình 94°C: 3 min 30s; (94°C: 30s; 58°C: 50s; 72°C: 1 min

20s) lặp lại 30 chu kỳ; 72°C: 10 min; 4°C:  $\infty$ .

Tách dòng đoạn gen *B* được tiến hành bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector pBT. Xác định trình tự DNA theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977). Sử dụng phần mềm BioEdit, Clustal W để phân tích trình tự nucleotide. Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

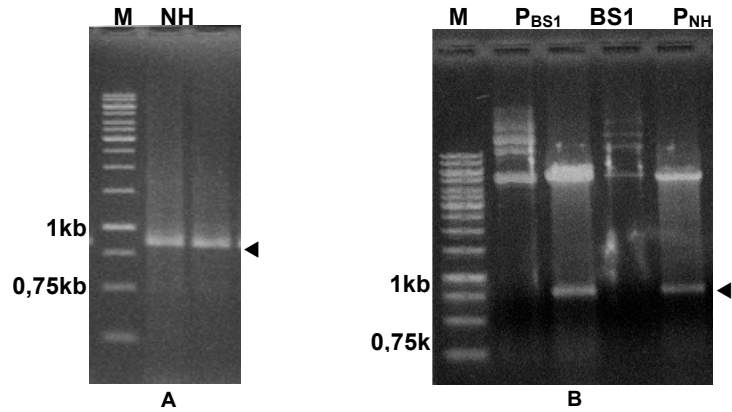
### Kết quả chọn dòng mang đoạn gen *B* từ 2 giống ngô nếp địa phương NH và BS1

Để nghiên cứu sâu hơn về cơ sở phân tử của sinh tổng hợp anthocyanin liên quan đến hạn, hai giống chịu hạn tốt (NH) và chịu hạn kém (BS1) được sử dụng để phân lập và tạo dòng đoạn gen *B*. RNA tổng số của 2 giống ngô NH và BS1 được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi oligo(dT)<sub>18</sub>, BF1 và BR1 để phát hiện gen *B*. Sản phẩm PCR thu được rất đặc hiệu, có kích thước khoảng 0,8 kb (Hình 1A).

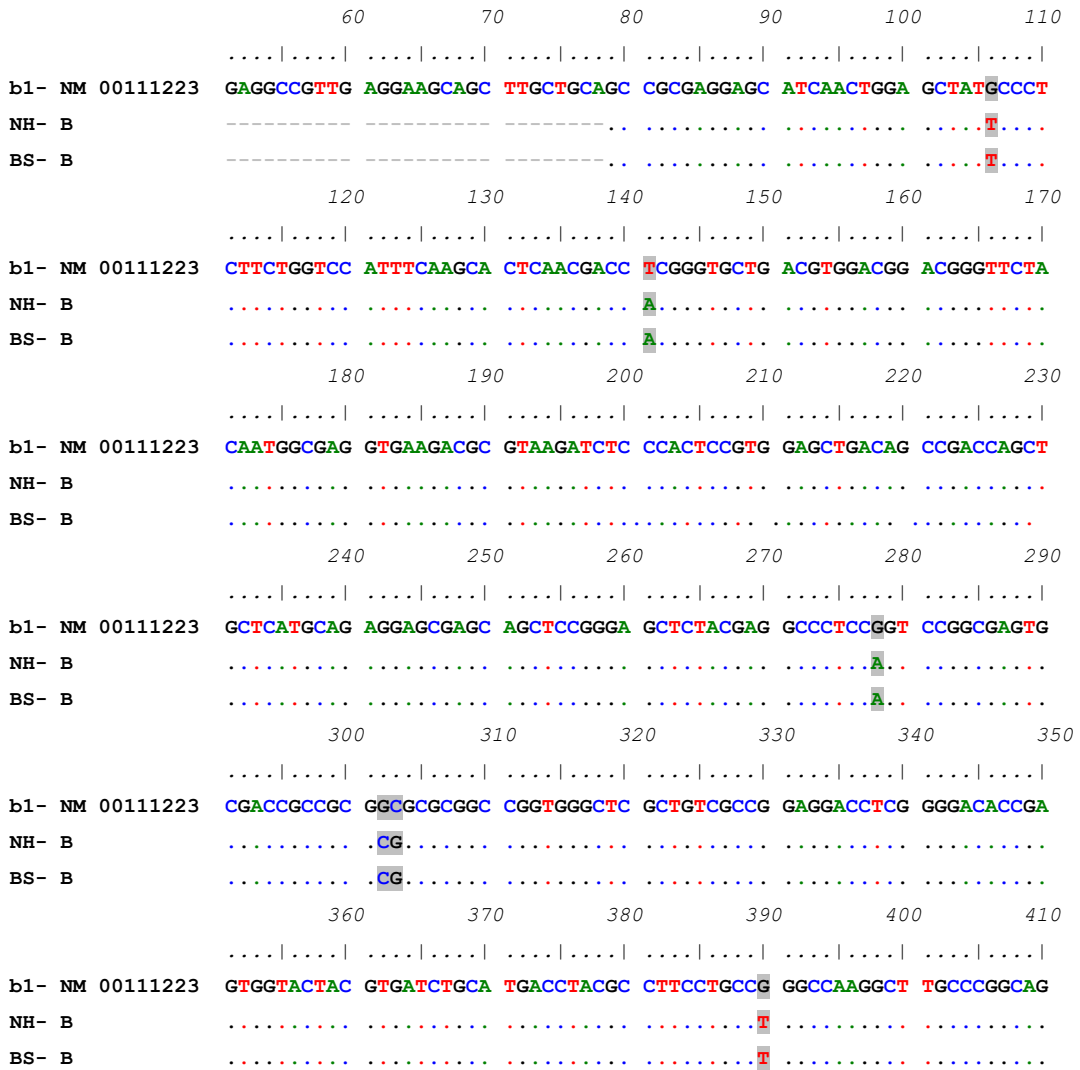
Sản phẩm PCR của hai giống ngô NH và BS1 được gắn trực tiếp vào vector tách dòng, biến nạp vào chủng *E. coli* và cấy trên môi trường chọn lọc có carbenicillin. Để kiểm tra kích thước thực tế của đoạn cDNA xen vào, các mẫu DNA plasmid thu được được xử lý cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI. Kết quả điện di 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 cDNA gen *B* 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).

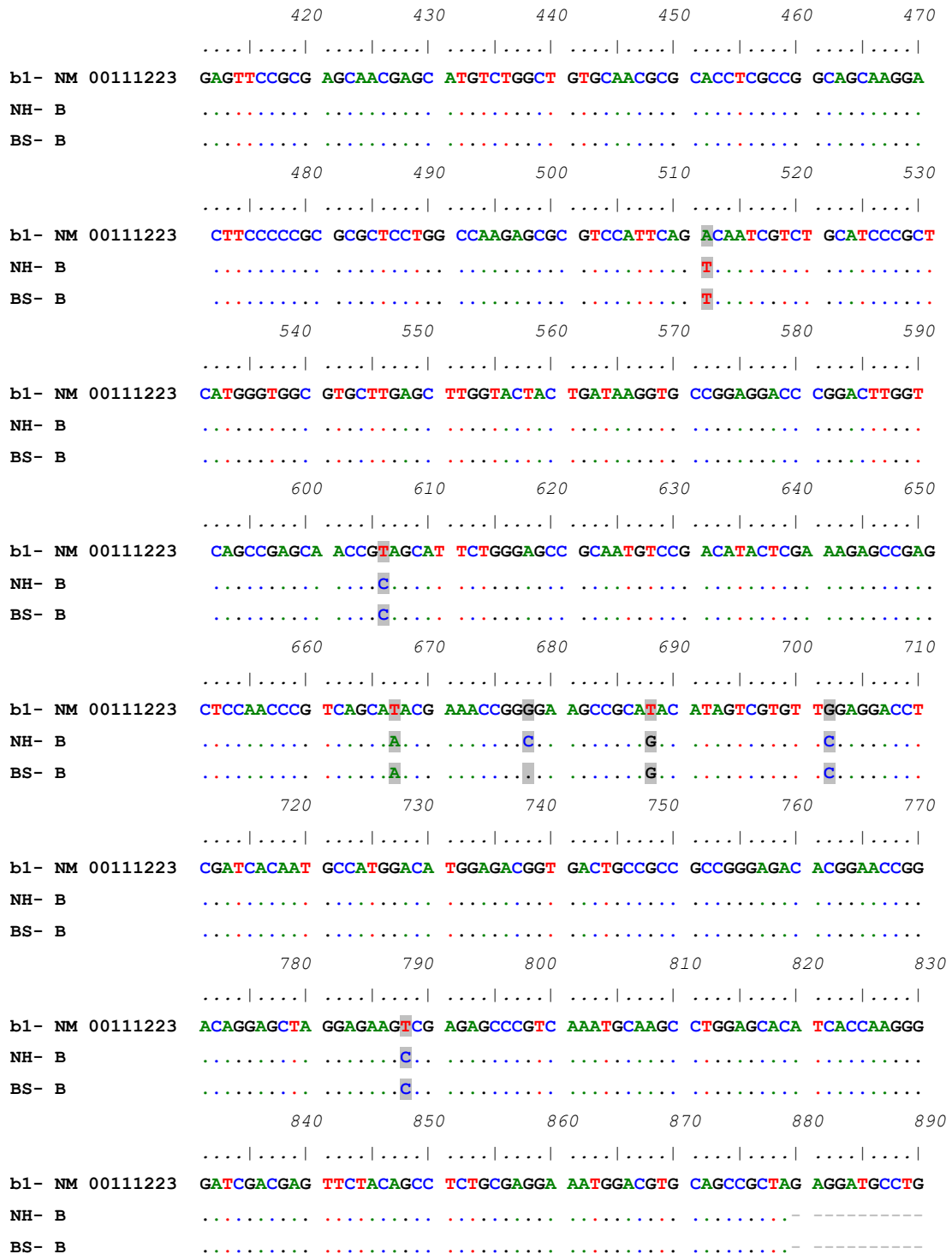
### Kết quả xác định trình tự nucleotide của đoạn gen *Lc* của hai giống ngô nếp NH và BS1

Trình tự đoạn gen *B* của hai giống ngô nếp BS1 và NH được tiến hành xác định theo phương pháp Sanger trên máy xác định trình tự DNA tự động. Để kiểm tra kết quả, phần mềm sinh học Clustal W 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 mã hóa trên cDNA của gen *B* dài 1689 nucleotide và mã hóa cho 562 amino acid. Trình tự đọc được dài 801 bp là một phần của gen *B*, mã hóa cho 267 amino acid (Hình 2). Đoạn peptide suy diễn của trình tự đọc được thuộc vị trí từ 27 đến 267 của phân tử protein B hoàn chỉnh. Đoạn này thuộc một phần vùng MIR và vùng có tính acid của họ bHLH.



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





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

### So sánh trình tự của đoạn gen B của hai giống ngô nếp NH và BS1

Trình tự nucleotide của đoạn gen B ở hai giống BS1 và NH tương đồng 98% với trình tự cDNA (mã số NM\_001112236 và KC\_771884). Đoạn gen B được xác định tương đồng với trình tự nucleotide phía đầu của gen B hoàn chỉnh.

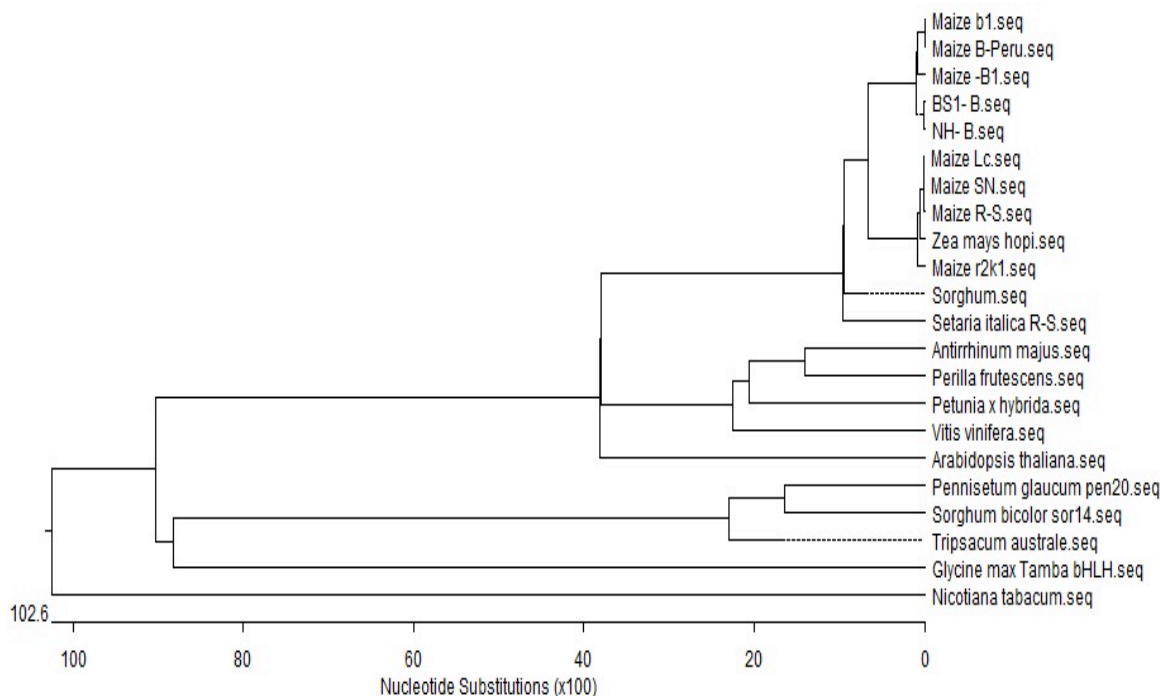
Trình tự đoạn gen B ở hai giống NH và BS1 khác nhau ở 1 vị trí thay thế thuộc các nucleotide thứ 678 (Hình 2). Trình tự của giống BS1 có 12 vị trí sai khác so với trình tự cDNA của gen *b1* (gen điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin thuộc họ bHLH, mã số trên GenBank NM\_001112236). Trình tự của giống

NH có 13 vị trí sai khác so với *b1*.

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

Dựa vào các trình tự nucleotide của gen B và các gen trong họ bHLH trong con đường 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 gen B ở hai giống thu được có sự tương đồng cao với trình tự gen *b1*, *B1* và *B-Peru* trên GenBank (98,8%, 99,1% và 98,8%).



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

### So sánh cấu trúc của các vùng chức năng

Sự khác nhau về trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen B giữa hai giống NH và BS1 được trình bày ở hình 4. Kết quả cho thấy, vùng MIR của protein B (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 mã hóa cho các enzyme tham gia chuyển hóa tổng hợp anthocyanin. Vùng này có 9 vị trí amino acid khác nhau giữa NH và BS1 so với

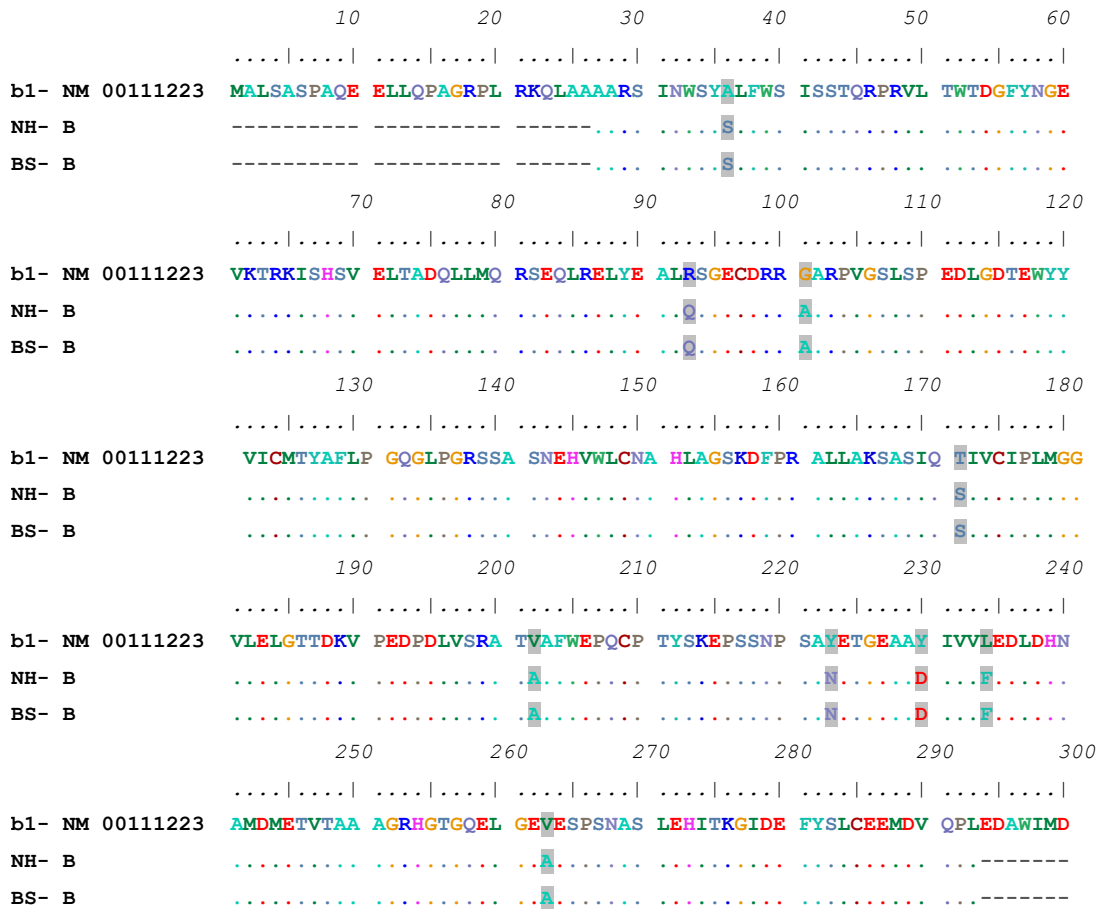
trình tự protein *b1* trên GenBank (vị trí 36, 93, 101, 171, 202, 223, 230, 234 và 281). Trong đó cDNA của hai giống khác nhau ở một vị trí nhưng hoàn toàn giống nhau về amino acid.

Vùng có tính acid (thuộc vị trí từ 253- 410) thường là nơi tương tác với protein WD40 và PAC1 điều hòa con đường anthocyanin. Vùng này có một vị trí amino acid khác nhau (V281 của *b1*, A281 của NH và BS1).

Gen *B* được biết đến với vai trò kích hoạt hai gen cấu trúc *Al*, *Bz1* phiên mã, xác định sắc tố trong lá, vỏ, và râu. Đây là một thành viên có sự tương đồng với gen tương ứng ở *Sorghum paralog*s hơn ba gen còn lại trong họ (Szankowski *et al.*). Trong hạt ngô giống, gen *R* và *B* có thể thay thế cho nhau trong việc hình thành màu nội nhũ. Chuỗi amino acid suy diễn của hai gen này tương đồng >91%, trong đó sự

sai khác chủ yếu thuộc vùng 5' của gen.

Như vậy, sự thay đổi về một số nucleotide và amino acid của protein này có thể là nguyên nhân làm tăng hàm lượng anthocyanin và tính chịu hạn cho cây ngô. Tuy nhiên để khẳng định điều này cần phải nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và sự biểu hiện của protein trên.



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

## KẾT LUẬN

Đã tách dòng và xác định trình tự đoạn gen *B* từ giống NH và BS1. Trình tự đoạn gen *B* gồm 801 nucleotide mã hóa cho 267 amino acid.

Protein suy diễn của đoạn gen *B* có 9 vị trí amino acid thay đổi giữa hai giống NH và BS1 so với trình tự b1 trên GenBank. Trình tự nucleotide

của gen *B* ở hai giống thu được có sự tương đồng cao với trình tự gen *b1*, *B1* và *B- Peru* trên GenBank (98,8%, 99,1% và 98,8%).

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ và giúp đỡ từ phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen và phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castellarin SD, Matthews MA, Di GG, Gambeta G (2007) Water deficit accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227(1): 101-112.
- 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 (2006) Flavonoid functions in plants. CRC Press, Boca Raton: 397- 441.
- Gould KS, Davies K, Winefield C (2008) Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications. New York: Springer Science and Business Media, LLC.
- Hooijmaijers CAM, Gould KS (2007) Photoprotective pigments in red and green gametophytes of two New Zealand liverworts. *New Zeal J Bot* 45: 451-461.
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 20: 288-303.
- 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.
- Selma MV, Martínez-Culebras PV, Aznar R (2008) Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Int J Food Microbiol* 122 (1-2): 126- 134.
- 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 (8/2013) Niên giám thống kê 2012. 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 GENE FRAGMENT CONTAINING SEQUENCES OF B GENE ACTIVATES ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS IN LOCAL STICKY CORN CULTIVARS (*ZEA MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)

Pham Thi Thanh Nhan<sup>1,✉</sup>, Le Hoang Duc<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thu Nga<sup>1</sup>, Le Tran Binh<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University

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

<sup>3</sup>University of Science and Technology of Hanoi

### SUMMARY

Sticky corn (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) is one of the widely grown plants in Vietnam, especially in mountainous regions. The local cultivars play an important role for people living in regions with water limitation and mountain slopes. Anthocyanin is considered a sign of the stress caused by drought. The expression of the structural genes and enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in parts of maize require the presence of transcription factors belonging to MYB, Myc (or bHLH) and WD40. Genes of the MYB family regulating anthocyanin biosynthesis have been studied including *Cl* (Colored Aleurone 1), *P1* (Purple), *P1* (Purple leaf). Similarly, genes of Myc family (or bHLH) have been studied including *B*, *R*, *Sn* and *Lc* (Leaf color). Locus B (or b1) consist of alleles *B-I*, *B-Peru*, *B-Bolivia*. These proteins activate structural genes *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *Bz*, in which *CHS*, *DFR* and *F3H* are key genes of the anthocyanin biosynthesis. This paper analyzed the sequence of a segment of *B* gene that activates anthocyanin biosynthesis. We have cloned and determined the sequence of a part of genes *B* from NH and BS1 maize cultivars. The sequence consists of 801 nucleotides encoding 267 amino acids. The deduced protein of segments of gene *B* has 9 amino acid position changes among NH, BS1 and *b1* gene on GenBank. The sequence of a segment of *B* gene in NH and BS1 had high similarity with genes *b1*, *B1* and *B-Peru* (98.8%, 99.1% and 98.8%).

**Keywords:** Anthocyanin, drought tolerance, B gene, local sticky corn, Myc

✉ Author for corresspondence: Tel: +84-989 516 346; E-mail: [ptnhansptn@gmail.com](mailto:ptnhansptn@gmail.com)