

TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN ECHB1 LIÊN QUAN ĐẾN CƠ CHẾ LÀM TĂNG CHIỀU DÀI SỢI GỖ Ở BẠCH ĐÀN

Trần Đức Vượng¹, Ohtani Misato², Trần Hồ Quang¹, Taku Demura².

¹Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Viện nghiên cứu RIKEN, Nhật Bản

TÓM TẮT

EcHB1 là gen mã hóa protein liên quan đến cơ chế làm tăng chiều dài sợi gỗ. Trong bài báo này chúng tôi đã tiến hành tạo dòng và xác định trình tự gen EcHB1 từ bạch đàn *Eucalyptus grandis*. Kết quả cho thấy gen được phân lập và có kích thước 759bp mã hóa cho 252 amino acid. Khi so sánh với trình tự gen trên ngân hàng gen cho thấy có một nucleotide sai khác ở vị trí 112(A và G) của đoạn gen. Tuy nhiên, sự sai khác này không ảnh hưởng đến sự sai khác trong trình tự amino acid của đoạn gen mã hóa. Plasmids mang gen EcHB1 được sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo về chuyển gen vào loài bạch đàn tại Việt Nam.

Từ khóa: Bạch đàn, Chiều dài sợi gỗ, Gen EcHB1, Phân lập gen.

MỞ ĐẦU

Một trong những mục tiêu của chương trình cải thiện giống cây rừng hiện nay là cải thiện chất lượng gỗ nhằm tạo ra các giống cây trồng mới có chất lượng gỗ tốt (Hà Huy Thịnh và cộng sự, 2010) phục vụ cho ngành công nghiệp sản xuất ván dăm, ván MDF, gỗ cho công nghiệp giấy, gỗ xẻ đóng đồ mộc. Trong đó, hướng nghiên cứu về tạo ra những giống cây trồng mới có chất lượng gỗ tốt hơn như hàm lượng cellulose cao, hàm lượng lignin thấp, sợi gỗ dài hơn phục vụ cho ngành công nghiệp chế biến giấy là một trong những yêu cầu cần thiết.

Ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để chọn tạo các giống cây trồng mang đặc điểm mong muốn là hướng đi được nhiều phòng thí nghiệm đặc biệt quan tâm. Một số gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp lignin, cellulose, tính chất gỗ cũng đã được xác định cho các loài bạch đàn *Eucalyptus globulus* (Poke và cộng sự, 2003); *E. gunnii* (Lauvergeat và cộng sự, 2002); *E. camaldulensis* (Ho và cộng sự, 2002); *E. grandis* (Ranik và Myburg, 2006). Các gen liên quan đến tăng khả năng hấp thụ lân cũng đã được phân lập từ bạch đàn *E. camaldulensis*, trong số 5 gen được phân lập thì chỉ có 2 gen có khả năng làm tăng độ hấp thụ lân trên cả điều kiện nghèo và giàu lân (Koyama và cộng sự, 2006). Các gen mã hóa cho quá trình tổng hợp cellulose (cellulose synthase *CesA* gene) đã được phân lập và nghiên cứu (Myburg và cộng sự, 2008). Bấy gen mã hóa sinh tổng hợp cellulose đã được phân lập từ bạch đàn *grandis* các gen này được cho là đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất cellulose về chất lượng cũng như độ dài sợi gỗ.

Các gen liên quan đến nhân tố phiên mã (transcription factor genes) có chức năng kiểm soát quá trình biểu hiện các gen mã hoá cho các enzyme trong con đường sinh tổng hợp thành tế bào ở cây. Đây là các gen chìa khoá có tác dụng tăng cường hoặc kìm hãm các hoạt động của các gen khác (Rueda và cộng sự, 2005). Gen *EcHB1* thuộc họ gen liên quan đến nhân tố phiên mã, mã hoá cho HD-zip nhóm II (Homeodomain leucine zipper). Gen này ảnh hưởng đến quá trình hình thành xylem ở cây. Kết quả nghiên cứu của Sonoda và cộng sự (Sonoda và cộng sự, 2009) cho thấy gen *EcHB1* dưới sự điều khiển của promotor CaMV35S được chuyển vào cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), sau 6 tháng trồng trong nhà lưới cho chiều dài sợi gỗ tăng hơn 1,5 lần so với cây đối chứng.

Trong nội dung nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tách gen *EcHB1* ở cây Bạch đàn *Eucalyptus grandis* với mục đích tạo nguồn vật liệu gen ban đầu phục vụ cho công tác tạo giống cây trồng biến đổi gen phục vụ mục tiêu cải thiện giống theo hướng chất lượng gỗ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các mẫu lá Bạch đàn *E. grandis* do Viện Nghiên cứu Giấy thuộc công ty Giấy OJI (OJI Paper company) - Nhật Bản cung cấp. Mẫu lá được xử lý bằng Ni tơ lỏng và bảo quản trong tủ lạnh -80°C.

Các hóa chất chính được sử dụng gồm: Vector tách dòng PCR[®] 8/GW/TOPO[®]/ TA cloning Kit, tế bào khả biến Transform One Shot[®]Chemically Competent *E. coli* (TOPO10 strain), kit tổng hợp cDNA (Invitrogen- Nhật Bản), kit thổi gene, kit tách plasmid (Takara- Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên trình tự gene *EcHB1* được công bố trên ngân hàng gene quốc tế (NCBI mã số AB458829). Cặp mồi được thiết kế để phân lập gene *EcHB1* từ genome của bạch đàn *Eucalyptus grandis*. Cặp mồi đặc hiệu EcHB1- F (5'-ATGTGCCCTATCGATTCGG-3') và EcHB1-R (5'-TTAACAAGCGGCTGATGGATGAGC-3') được thiết kế để khuếch đại gen EcHB1(759 nucleotides).

Tách chiết RNA tổng số từ các mẫu bạch đàn *E. grandis* bằng bộ kit Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen). Tổng hợp sợi đơn thứ nhất cDNA (First strand cDNA) từ mRNA bằng enzyme sao mã ngược Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Sau đó từ sợi đơn cDNA phản ứng RT-PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi EcHB1-F và EcHB1-R với chu trình như sau: bước 1: 94°C, 2 phút; bước 2: 98°C, 10 giây; bước 3: 60°C, 30 giây; bước 4: 68°C, 1 phút; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu trình; bước 5: 68°C, 10 phút; bước 7: 4°C, bảo quản mẫu.

Sau đó sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X, nhuộm gel trong dung dịch Ethidium bromide và tinh sạch DNA bằng bộ kit Takara RECOCHIP của hãng TAKARA BIO INC (Nhật Bản).

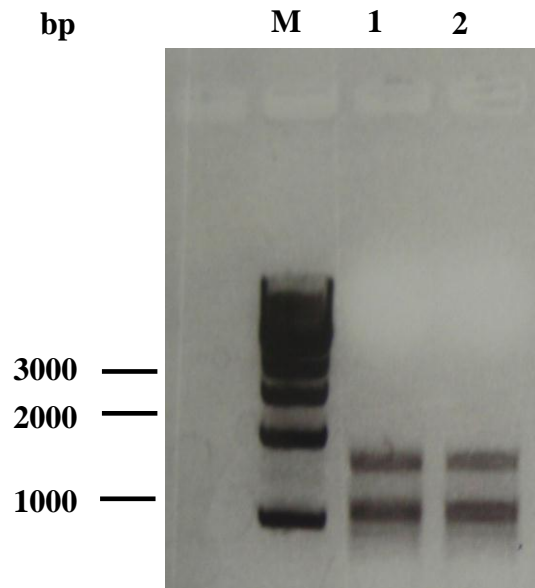
Gene EcHB1 sau khi phân lập được gắn vào Vector tách dòng (PCR[®] 8/GW/TOPO[®]). Sản phẩm tách dòng được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* (TOP10 strains) và được nuôi cấy trên môi trường LB (1% Tryptone, 0,5% Yeast Extract, 1% NaCl, pH 7,0) có chứa 50ng Spectinomycin và ủ ở nhiệt độ 37 °C qua đêm.

Plasmid có chứa gene EcHB1 tách chiết từ các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường kháng sinh chọn lọc. Trình tự nucleotide của gene EcHB1 và vector được xác định trên máy giải trình tự gen AB PRISM 3100 (Applied Biosystem). Kết quả trình tự gen được phân tích và so sánh bằng phần mềm sinh học chuyên dụng Ape (A plasmid Editor) và phytozome V8.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen *EcHB1*

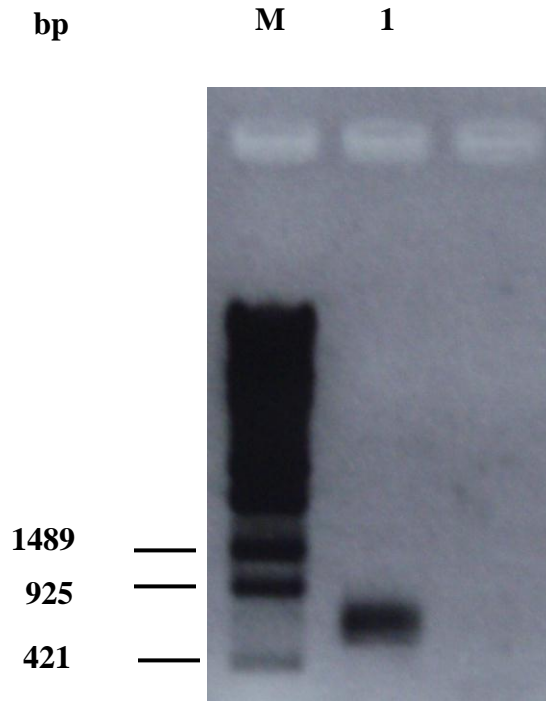
RNA tổng số được tách chiết từ lá bạch đàn *E. grandis* sử dụng phương pháp tách chiết sử dụng bộ kit “Invitrogen Plant RNA Reagent” (Hình 1). Hình ảnh cho thấy hàm lượng cũng như chất lượng RNA rất tốt dùng cho phản ứng tổng hợp sợi đơn cDNA và làm khuôn cho phản ứng PCR.



Hình 1: RNA tổng số tách chiết từ bạch đàn *E. grandis*.

M: marker DNA 1 kb; 1 và 2: sản phẩm RNA

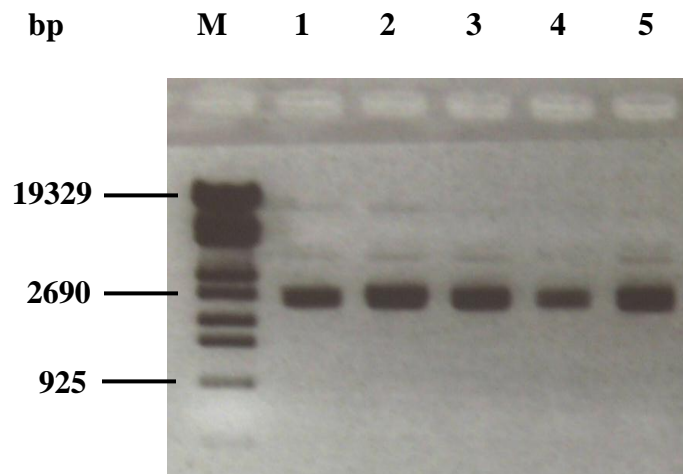
Với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen EcHB1, phản ứng RT-PCR được tiến hành. Sản phẩm RT-PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 2), kết quả cho thấy kích thước của sản phẩm RT-PCR khoảng 750 bp tương ứng với kích thước theo tính toán lý thuyết.



Hình 2: Tách dòng gen EcHB1. M: Lambda DNA/Sty I Digest; 1: sản phẩm nhân gen EcHB1 bằng kỹ thuật RT-PCR từ bạch đàn *Eucalyptus grandis*

Tách dòng gen bằng vector tách dòng PCR® 8/GW/TOPO®.

Gen *EcHB1*, sau khi được phân lập bằng phản ứng PCR được gắn thêm một Adenine (phương pháp TA cloning) nhằm tạo ra đầu 3' của sản phẩm PCR chứa thêm A (adenine) nhằm để tạo liên kết với đuôi T trong vector tách dòng PCR® 8/GW/TOPO® bằng phản ứng ghép nối (Earley và cộng sự, 2006, Hoekema và cộng sự, 1983, Lee và Gelvin, 2008). Sản phẩm PCR này được gắn vào vector tách dòng và được biến nạp vào vi khuẩn One Shot® *E. coli* TOP10. Khuẩn lạc chứa plamid mang gen *EcHB1* được chọn lọc trên môi trường LB chứa kháng sinh spectinomycin. Để khẳng định quá trình ghép nối thành công các khuẩn lạc phát triển tốt trên môi trường chọn lọc kháng sinh sẽ được nhân lên và tách chiết plasmid và kiểm tra điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả cho thấy kích thước của plasmid có kích thước khoảng gần 2700bp (Hình 3), điều này chứng tỏ rằng gen *EcHB1* đã gắn thành công vào vector tách dòng mong muốn đúng với tính toán lý thuyết.



Hình 3. Plasmid chứa gene *EcHB1* được phân lập từ *E. Coli*
M: Lamda DNA/Sty I Digest; 1-5: Các Plasmid có chứa gen *EcHB1*

Phân tích trình tự gen *EcHB1*

Để kiểm tra chính xác xem gen đã gắn kết với vector tách dòng và tạo ra plasmid mang gen *EcHB1* chưa, chúng tôi tiến hành giải trình tự nucleotide của sản phẩm plasmid này. Kết quả phân tích trình tự cho thấy, đoạn cDNA phân lập được là trình tự của gen *EcHB1* có kích thước 759bp mã hóa cho 252 amino acid và mã kết thúc là TAA. Kết quả giống với một số công bố trước đây (Sonoda và cộng sự, 2009) (Hình 4A và 4B). Khi so sánh trình tự nucleotide gen *EcHB1* phân lập với trình tự gen này trên ngân hàng gen (mã số AB458829) bằng chương trình Blast, chúng tôi thấy trong số 759 nucleotide, chỉ có một nucleotide sai khác ở vị trí 112(A và G) của đoạn gen (hình 4A). Tuy nhiên, sự sai khác này không ảnh hưởng đến sự sai khác trong trình tự amino acid của đoạn gen này mã hóa (hình 4B). Độ tương đồng về trình tự amino acid giữa hai trình tự so sánh là 100%.

```

*           *           *           *           *           *           *           *           *
1>CGTGGTCAATATGATTTTATTTTGGACTGATAGTGACCTGTTGCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGC>100
0>~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~>0

*           *           *           *           *           *           *           *           *
101>GGCTCCGAAITCGCCCTTATGTGCCCTATCGATTTCGGGCCGCTCCTTCGACACGAGCCTTAGTCTCGGTTTAGGCTGTTATGGGGATCCTGAAGATCACG>200
1>~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~>82

*           *           *           *           *           *           *           *           *
201>AGATCAAGATCAAGAAACCGCTCGCGAAGCTCAGTGGTAACTCCACGTGCCTCACGATAGGCTTGCCCGGGCGGGAGGCGTGC GGCTGGGATCCGCGAG>300
83>AGATCAAGATCAAGAAACCGCTCGCGAAGCTCAGTGGTAACTCCACGTGCCTCACGATAGGCTTGCCCGGGCGGGAGGCGTGC GGCTGGGATCCGCGAG>182

*           *           *           *           *           *           *           *           *
301>TGGGGACGAGGTCAGGAACATCCCGAGCAGGTCGGCATCGTCTTCAAACCTCAAGCAGTGCGAAGAGGGAGAAGGCGGAGCAAGGAGAGGAAGAAGCG>400
183>TGGGGACGAGGTCAGGAACATCCCGAGCAGGTCGGCATCGTCTTCAAACCTCAAGCAGTGCGAAGAGGGAGAAGGCGGAGCAAGGAGAGGAAGAAGCG>282

*           *           *           *           *           *           *           *           *
401>GTTGAGAGAGGGACGGGCTCGCCGAGGGCGACTATCAATATCGAAGATGAAGATGAGTTCAGCCCCAGGAAGAAGCTCAGGCTTTCTAAAGCACAAAGTT>500
283>GTTGAGAGAGGGACGGGCTCGCCGAGGGCGACTATCAATATCGAAGATGAAGATGAGTTCAGCCCCAGGAAGAAGCTCAGGCTTTCTAAAGCACAAAGTT>382

*           *           *           *           *           *           *           *           *
501>CCATTTTGAAGAGAGCTTCAAAGCGCACACAACCTCAACACTAAACAAAAGCAGATTTGGCAAATCGGTTGAATCTCCGGCCACGGCAAGTGGAGT>600
383>CCATTTTGAAGAGAGCTTCAAAGCGCACACAACCTCAACACTAAACAAAAGCAGATTTGGCAAATCGGTTGAATCTCCGGCCACGGCAAGTGGAGT>482

*           *           *           *           *           *           *           *           *
601>GTGGTTCAGAAATAGGAGAGCCAGGACTAAATTAACAACAACTGAAGTAGAGTGCAGATGCTGAAGAAATGCTGCGAAACCTAAAAGAAGAGAACAGA>700
483>GTGGTTCAGAAATAGGAGAGCCAGGACTAAATTAACAACAACTGAAGTAGAGTGCAGATGCTGAAGAAATGCTGCGAAACCTAAAAGAAGAGAACAGA>582

*           *           *           *           *           *           *           *           *
701>AGGTTGAAGAAGGAGTTGCAAGAGCTCAAGTCATTGAAGCCAACTGCGTTCGGTTTATAGGCAGATTCTGCAGCTGCTCCTCTATGCCCTTCTTGTG>800
583>AGGTTGAAGAAGGAGTTGCAAGAGCTCAAGTCATTGAAGCCAACTGCGTTCGGTTTATAGGCAGATTCTGCAGCTGCTCCTCTATGCCCTTCTTGTG>682

*           *           *           *           *           *           *           *           *
801>AAAGGATTGCCCATCCAGAATTCCTGACTGAATCTCGACTTTGGCCTGCTCATCCATCAGCCGCTTGTTAAAGGGGCGAATTCGACCCAGCTTT>900
683>AAAGGATTGCCCATCCAGAATTCCTGACTGAATCTCGACTTTGGCCTGCTCATCCATCAGCCGCTTGTTAA~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~>759

```

Hình 4a. So sánh (alignment) trình tự nucleotide của gene được phân lập với trình tự đã công bố (Mã số: AB458829)

53 genes identified:

Define	Score	E	query sequence
Eucgr.F02206.1 (Egrandis_v1_0.02408...	405.6	1.8e-113	253 1-252

HSP#1: Score: 405.6bits (1041.0) E-value: 1.8e-113 Identity: 100.0% (252/252) Positive: 100.0% (252/252) Frame: +0/+0

```

MCPIDSGRSFDTLSLGLGCGYDPEDHEIKIKKPLAKLSGNSTCLTIGLPGGEACGLGSASGDEVNRNIPSRASFSNSSSAKREKAEQGEEEAVERGTG Query
MCPIDSGRSFDTLSLGLGCGYDPEDHEIKIKKPLAKLSGNSTCLTIGLPGGEACGLGSASGDEVNRNIPSRASFSNSSSAKREKAEQGEEEAVERGTG
MCPIDSGRSFDTLSLGLGCGYDPEDHEIKIKKPLAKLSGNSTCLTIGLPGGEACGLGSASGDEVNRNIPSRASFSNSSSAKREKAEQGEEEAVERGTG Subject

SPRATINIEDEDEFSRPRKLRLSKAQSSILEESFKAHTTLNITKQKHDLANRLNLRPRQVEVWFQNRRTARTRKQTEVECEMLKCCETLKEENRRLKKEK Query
SPRATINIEDEDEFSRPRKLRLSKAQSSILEESFKAHTTLNITKQKHDLANRLNLRPRQVEVWFQNRRTARTRKQTEVECEMLKCCETLKEENRRLKKEK
SPRATINIEDEDEFSRPRKLRLSKAQSSILEESFKAHTTLNITKQKHDLANRLNLRPRQVEVWFQNRRTARTRKQTEVECEMLKCCETLKEENRRLKKEK Subject

QELKSLKPTASVYRQIPAAALPLCPSCERIAHPEFFSTESRLWPAHPSAAC Query
QELKSLKPTASVYRQIPAAALPLCPSCERIAHPEFFSTESRLWPAHPSAAC
QELKSLKPTASVYRQIPAAALPLCPSCERIAHPEFFSTESRLWPAHPSAAC Subject

```

Hình 4b. So sánh trình tự amino acid của gene EcHB1 phân lập với trình tự amino acid trên ngân hàng gen NCBI (Mã số: BAH20553)

KẾT LUẬN

Gen EcHB1 từ bạch đàn *Eucalyptus grandis* liên quan đến cơ chế làm tăng chiều dài sợi gỗ đã được phân lập và tách dòng thành công. Gen phân lập và có kích thước 759bp mã hóa cho 252 amino acid. Khi so sánh trình tự gen phân lập được với trình tự gen trên ngân hàng gen cho thấy không có sự sai khác về trình tự amino acid, mặc dù có một sự sai khác về trình tự nucleotide.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với kinh phí của đề tài "Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ ở Việt Nam" thuộc Chương trình công nghệ sinh học nông nghiệp và thủy sản. Công trình được thực hiện và hoàn thành với sự trợ giúp từ các chuyên gia nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu RIKEN- Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà Huy Thịnh, Lê Đình Khả, Phí Hồng Hải, 2010. Một số thành tựu về cải thiện giống cây rừng trong 20 năm xây dựng và trưởng thành của Trung tâm Nghiên cứu giống cây rừng. Tạp chí khoa học Lâm nghiệp 1389-1404.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. S., 2006.
- Gateway- compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. The Plant Journal 45, 616-629.
- Ho, C.-K., Chen, Y.-C., Chen, Z.-Z., 2002. cDNA cloning and sequence analysis of 5-hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase from *Eucalyptus camaldulensis*. Taiwan Journal of Forest Science 17, 429-438.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303, 179-180.
- Koyama, T., Kato, N., Hibino, T., Kawazu, T., Kimura, T., Sakka, K., 2006. Isolation and expression analysis of phosphate transporter genes from *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Biotechnology 23, 215-218.

7. Lauvergeat, V., Rech, P., Jauneau, A., Guez, C., Coutos-Thevenot, P., Grima-Pettenati, J., 2002. The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Molecular Biology* 50, 497-509.
8. Lee, L. Y., Gelvin, S. B., 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology* 146, 325-332.
9. Myburg, A., Bradfield, J., Cowley, E., Creux, N., Castro, M. d., Hatherell, T. L., Mphahlele, M., O'Neill, M., Ranik, M., Solomon, L., Victor, M., Zhou, H., Galloway, G., Horsley, T., Jones, N., Stanger, T., Bayley, A., Edwards, N., Janse, B., 2008. Forest and fibre genomics: biotechnology tools for applied tree improvement. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 71, 59-68(10).
10. Poke, F. S., Vaillancourt, R. E., Elliott, R. C., Reid, J. B., 2003. Sequence variation in two lignin biosynthesis genes, cinnamoyl CoA reductase (*CCR*) and cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (*CAD2*). *Mol Breeding* 12, 107-118.
11. Ranik, M., Myburg, A. A., 2006. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiology* 26, 545-556.
12. Rueda, E. C., Dezar, C. A., Gonzalez, D. H., Chan, R. L., 2005. Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when expressed in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology* 46, 1954-1963.
13. Sonoda, T., Koita, H., Nakamoto-Ohta, S., Kondo, K., Suezaki, T., Kato, T., Ishizaki, Y., Nagai, K., Lida, N., Sato, S., Umezawa, T., Hibino, T., 2009. Increasing fiber length and growth in transgenic tobacco plants overexpressing a gene encoding the *Eucalyptus camaldulensis* HD-Zip class II transcription factor. *Plant Biotechnology* 26, 115-120.

CLONING AND SEQUENCING OF ECHB1 GENE RELATED TO MECHANISM OF INCREASING FIBER LENGTH IN EUCALYPTUS SPECIES

Tran Duc Vuong¹, Ohtani Misato², Tran Ho Quang¹, Taku Demura².

¹*Vietnamese Academy of Forest Sciences*

²*RIKEN Biomass Engineering Program, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

SUMMARY

In this study, we cloned and sequenced a full length cDNA encoding EcHB1 gene from *Eucalyptus grandis*. The EcHB1 gene is 759bp in length and it encodes a 252 amino acid protein. Alignment of the isolated sequence and that of the Genebank (AB458829) indicated that one nucleotide is different between two sequences (A and G in 112 position). However, the difference in nucleotide sequence does not impact the amino acid sequence. The isolated plasmids contain EcHB1 gene is a good starting material for further study on gene transformation of *Eucalyptus* species.

Keywords: Cloning, EcHB1 gene, *Eucalyptus*, Fiber length

Người thẩm định: TS. Lê Văn Sơn