

Đặc điểm phân tử của gen *defensin 1* phân lập từ một số mẫu ngô có khả năng kháng một khác nhau

Vì Thị Xuân Thủy^{1*}, Hồ Mạnh Tường²
Lê Văn Sơn², Nguyễn Vũ Thanh Thanh³, Chu Hoàng Mậu⁴

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

⁴Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 2.7.2015, ngày chuyển phản biện 9.7.2015, ngày nhận phản biện 6.8.2015, ngày chấp nhận đăng 12.8.2015

Defensin thực vật là protein hình cầu nhỏ, giàu cystein (Cys), có tác dụng chống lại nấm, vi khuẩn và đặc biệt là một. Defensin liên kết với trung tâm hoạt động của α -amylase trong ruột một, do đó ức chế quá trình tiêu hóa tinh bột của một. Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày kết quả đánh giá khả năng kháng một, tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* từ mARN của các mẫu ngô địa phương Maison, Laocai, Simacai, Luthan và giống ngô lai CP888. Trong đó, giống ngô lai CP888 có khả năng kháng một thấp nhất, cao nhất là mẫu Maison. Gen *ZmDEF1* phân lập được có kích thước 243 nucleotide, mã hoá protein defensin gồm 80 amino axit. Trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô địa phương chứa 8 Cys tạo nên 4 cầu nối disulfide, giống ngô lai CP888 có 7 Cys. Gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN có chiều dài 345 bp, gồm 2 exon và 1 intron. Gen *ZmDEF1* được sử dụng để tạo vector chuyển gen nhằm nâng cao khả năng kháng một của cây ngô.

Từ khóa: Cys, defensin, kháng một, một ngô, *Zea mays*, *ZmDEF1*.

Chỉ số phân loại 4.6

Mở đầu

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong năm loài cây lương thực chính của thế giới. Ở Việt Nam, ngô là cây trồng quan trọng thứ hai sau lúa. Hạt ngô chứa gần như đầy đủ các chất dinh dưỡng cho người và gia súc. Trong những năm gần đây, sản xuất ngô ở Việt Nam tăng nhanh nhờ sự phát triển mạnh của ngành chăn nuôi và công nghiệp chế biến. Đặc biệt từ những năm 90 trở lại đây, diện tích, năng suất và sản lượng ngô tăng liên tục nhờ các giống ngô lai mới được đưa vào sản xuất trên diện rộng.

Hạt ngô cũng như các loại ngũ cốc khác dễ bị một xâm hại. Một ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch.) là loại đa thực, chúng có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc, đậu, hạt có dầu và nhiều sản phẩm thực vật khác. Thức ăn thích hợp nhất với một là hạt ngô và gạo. Một trưởng thành dùng vòi khoét một lỗ sâu vào hạt, rồi đẻ trứng ở đó và tiết ra một thứ dịch nhầy để bít kín lỗ đó lại. Khi sâu non nở ra trong hạt ngô, nó thường ăn phôi trước, sau đó mới đến nội nhũ và các bộ phận khác, làm cho hạt chỉ còn lại một lớp vỏ mỏng. Khi đầy sức,

sâu non đục những lỗ nhỏ lộ rõ trên hạt để vũ hóa bay ra ngoài [1, 2].

Defensin thực vật là peptide cation và thuộc về một siêu họ lớn của các peptide kháng khuẩn được tìm thấy trong các sinh vật gọi chung là defensin. Khi gen mã hóa defensin thực vật hoạt động sẽ tổng hợp protein ức chế, ảnh hưởng đến chức năng kênh protein màng, làm suy yếu vi sinh vật, tăng cường khả năng chống chịu, làm thay đổi trạng thái oxy hoá khử axit ascorbic và đặc biệt ức chế hoạt động của α -amylase ở côn trùng. Liu và cs (2006) đã phân lập *defensin1* từ cây đậu xanh và chứng minh được vai trò chống côn trùng, kháng một của protein defensin1 (VrD1) [3]. VrD1 ức chế hoạt động của α -amylase cho nên kìm hãm sự tiêu hóa tinh bột trong ruột một. Pelegriani và cs (2008) đã nghiên cứu chức năng của defensin trong sự ức chế hoạt động của α -amylase ở ấu trùng một khi phân lập defensin1 từ cây đậu đũa (VuD1) [4], tuy nhiên, sự ức chế đối với α -amylase của động vật có vú là rất thấp [5].

Các giống ngô lai ở Việt Nam cho năng suất cao nhưng sản lượng, giá thành, chất lượng bị giảm nhiều

*Tác giả chính: Tel: 0983484171; Email: xuanthuytbu@gmail.com

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *DEFENSIN1* GENE ISOLATED FROM SOME CORN SAMPLES WITH DIFFERENCE IN RESISTANT LEVELS TO WEEVILS

Summary

Plant defensins are small cysteine-rich globular proteins, and resist well against fungi, bacteria and weevils. Defensins bind to the active site of α -amylase in the weevil gut, thus inhibiting starch digestion in weevils. In this report, the authors present the results on the ability to resist the weevils, cloning and determining the *ZmDEF1* gene sequence of four local maize samples Maison, Laocai, Simacai, Luthan and a hybrid maize CP888. The CP888 performed lowest resistant ability to weevils, while Maison had highest one. The coding region of *ZmDEF1* gene isolated from some maize samples had the size of 243 nucleotides, encoding 80 amino acids. The nucleotide sequences of *ZmDEF1* gene of the samples have 5 positions that were different in nucleotide order. Deduced amino acid sequences of defensins of the local maize samples have 8 cysteines that made 4 disulfide bridges; hybrid maize CP888 had 7 cysteines. *ZmDEF1* gene isolated from DNA had the size of 345 bp and consisted of two exons and one intron. The mRNA sequences of *ZmDEF1* gene could be used to create a transformation vector for gene transfer to improve the ability to resist weevils in maize.

Keywords: Cys, defensin, maize weevil, resistant to weevils, *Zea mays*, *ZmDEF1*.

Classification number 4.6

do hạt của các giống ngô này rất dễ bị mọt xâm hại. Các giống ngô địa phương miền núi phía Bắc nước ta tuy có năng suất thấp, hạt nhỏ nhưng có khả năng kháng mọt cao. Hiện nay, nhiều biện pháp bảo quản hạt ngô sau thu hoạch đã được áp dụng, nhưng tốn thời gian, hiệu quả thấp và tổn thất sau thu hoạch vẫn rất lớn. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng công nghệ tạo giống ngô kháng mọt đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, trong đó có chiến lược tạo cây ngô chuyển

gen kháng mọt. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả đánh giá khả năng kháng mọt và xác định trình tự nucleotide của gen *defensin1* (cADN) của các mẫu ngô nhằm phát triển vector chuyển gen mang cấu trúc *defensin1* phục vụ tạo dòng ngô chuyển gen có khả năng kháng mọt cao.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này sử dụng 4 mẫu ngô địa phương thu thập ở các tỉnh Sơn La (VN1), Lào Cai (VN2, VN3, VN4) và giống ngô lai CP888 do Trung tâm Giống cây trồng Sơn La cung cấp (bảng 1).

Bảng 1: các mẫu/giống ngô sử dụng nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Màu sắc hạt
1	Maison	VN1	Mai Sơn - Sơn La	220,82±0,63	Tím
2	Laocai	VN2	Sì Ma Cai - Lào Cai	220,38±0,84	Trắng
3	Simacai	VN3	Sì Ma Cai - Lào Cai	340,38±0,68	Trắng vàng
4	Luthan	VN4	Sì Ma Cai - Lào Cai	350,02±0,78	Vàng đỏ
5	CP888	CP888	Giống ngô lai CP888	310,92±1,16	Đỏ

Đánh giá khả năng kháng mọt của các mẫu ngô bằng cách xác định các chỉ tiêu: khối lượng ngô hao hụt, hệ số gia tăng quần thể, chỉ số miễn cảm với mọt.

Khối lượng ngô hao hụt ở lô thí nghiệm được tính theo công thức:

$$P = X - P_t - P_0 \text{ (g)}$$

Trong đó: P là khối lượng thức ăn hao hụt ở công thức thí nghiệm (g); P_t là khối lượng thức ăn cân được sau thời gian thí nghiệm; P_0 là khối lượng thức ăn hao hụt ở công thức đối chứng; X là khối lượng thức ăn đưa vào thí nghiệm (g) [6].

Hệ số gia tăng quần thể (r) được xác định theo công thức: $N_t = N_0 \times e^{rt}$

Trong đó: N_t là số lượng cá thể mọt ở thời điểm t; N_0 là số lượng cá thể mọt đưa vào thí nghiệm ban đầu; r là hệ số gia tăng quần thể [6].

Tỷ lệ nhiễm mọt = (Số hạt bị nhiễm mọt/tổng số hạt thí nghiệm) x 100%

Chỉ số miễn cảm với mọt tương đối (S) được tính theo công thức:

$$S = \frac{1}{2} \sin \alpha (a_n \cdot b_n + b_n \cdot c_n + c_n \cdot d_n + d_n \cdot e_n + \dots + k_n \cdot a_n)$$

Trong đó: S là chỉ số miễn cảm mọt tương đối; α là góc tạo bởi hai trục mang trị số liên nhau $\alpha = 360^\circ/12$; a, b, c, d... k là các chỉ tiêu theo dõi; n là ký hiệu các mẫu/giống nghiên cứu.

ARN tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent KIT; cADN được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cADN Synthesis KIT; gen *defensin1* phân lập từ ngô (*ZmDEF1*) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu được tổng hợp tại hãng Macrogen (Hàn Quốc) với trình tự như sau:

ZmDEF-F: 5'ACGCGTCGACATGGCGCCGTCTCGACGCA3'

ZmDEF-R: 5'CCCAAGCTTGCAGATCTTCTGCAGAAGCAC3'

Chu kỳ nhiệt của PCR là: 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ: 94°C/45 giây - 58°C/30 giây - 72°C/60 giây; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%; tinh sạch sản phẩm PCR theo GeneJET PCR Purification KIT và gắn vào vector tách dòng pBT rồi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30 giây). Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal, IPTG, kháng sinh carbenicilin và bằng colony-PCR với cặp mồi M13. Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử của Sambrook và Russell (2001) [7].

Trình tự gen *ZmDEF1* được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130 - USA/ Japan. Số liệu được xử lý bằng phần mềm BioEdit và DNASTar.

Kết quả và thảo luận

Đánh giá khả năng kháng một của các mẫu ngô nghiên cứu

Để xác định được khả năng kháng một của các mẫu ngô nghiên cứu, khối lượng hao hụt, hệ số gia tăng quần thể một và tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô nghiên cứu đã được xác định ở các thời điểm 15, 30, 45 và 60 ngày lây nhiễm một nhân tạo với 10 cặp một được thả, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: khối lượng ngô hao hụt, hệ số gia tăng quần thể một và tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô nghiên cứu

Mẫu	15 ngày nhiễm một			30 ngày nhiễm một			45 ngày nhiễm một			60 ngày nhiễm một		
	P(g)	r	N	P(g)	r	N(%)	P(g)	r	%	P(g)	r	N(%)
Maison	0,67	0,023	4,34	1,83	0,048	10,23	2,41	0,066	32,76	5,78	0,061	88,03
Laocai	1,12	0,036	6,22	3,12	0,071	15,88	4,62	0,093	46,21	10,88	0,087	100
Simacai	1,10	0,034	2,43	2,43	0,067	11,86	4,49	0,086	36,08	9,38	0,081	96,26
Luthan	0,86	0,031	4,22	2,14	0,062	9,53	3,62	0,076	32,68	8,93	0,072	89,14
CP888	1,72	0,042	7,86	3,96	0,079	17,38	5,52	0,098	48,63	11,87	0,083	100

Ghi chú: P(g): khối lượng ngô hao hụt ở lô thí nghiệm; r: hệ số gia tăng quần thể một; N(%): tỷ lệ nhiễm một của các mẫu ngô

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trọng lượng hao hụt của các mẫu ngô nghiên cứu tăng dần từ ngày nhiễm một

thứ 15 đến 60. Ở ngày nhiễm một thứ 60, khối lượng hao hụt của giống ngô lai CP888 là cao nhất (11,87 g), tiếp đến là mẫu Laocai (10,88 g), Simacai (9,38 g), Luthan (8,93 g) và thấp nhất là mẫu Maison (5,78 g). Cùng với khối lượng thức ăn hao hụt ở lô thí nghiệm, hệ số gia tăng quần thể một ở các thời điểm 15, 30, 45 và 60 ngày nhiễm một nhân tạo đã được xác định. Hệ số gia tăng quần thể là đại lượng biểu thị số lượng cá thể một gia tăng trong đơn vị thời gian và trên một cá thể. Hệ số gia tăng quần thể một của các mẫu ngô nghiên cứu tăng dần từ 15 đến 45 ngày nhiễm một, ngày thứ 60 thì hệ số này bắt đầu giảm do lúc này lượng thức ăn còn ít, hơn nữa số lượng cá thể một tăng lên, nên không đủ thức ăn cho quần thể, vì thế hệ số tử vong tăng lên. Ở ngày nhiễm một thứ 45, hệ số gia tăng quần thể của các mẫu nghiên cứu là cao nhất, trong đó ở mẫu Maison hệ số đạt 0,066 (thấp nhất trong các mẫu nghiên cứu) và giống ngô lai CP888 có hệ số cao nhất, đạt 0,098.

Mỗi bình thí nghiệm có số hạt ngô của các mẫu nghiên cứu bằng nhau và được thả 10 cặp một, sau cùng thời gian lây nhiễm một xác định tỷ lệ số hạt bị nhiễm một. Kết quả bảng 2 cho thấy, các mẫu ngô nghiên cứu có tỷ lệ nhiễm một tăng dần và đến 60 ngày thì các mẫu CP888 và Laocai đã nhiễm một 100%, còn mẫu Simacai nhiễm 96,26%, mẫu Luthan nhiễm 89,14% và thấp nhất là mẫu Maison nhiễm 88,03%. Từ các chỉ tiêu phân tích trên, đã xác định được chỉ số miễn cảm một tương đối của các mẫu ngô nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3: chỉ số tương đối về sự miễn cảm một (S) của các mẫu ngô nghiên cứu

Mẫu	Maison	Laocai	Simacai	Luthan	CP888
S	836,036	1.408,678	1.022,977	845,979	1.528,041

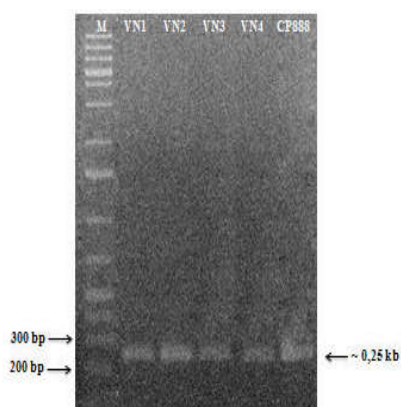
Kết quả ở bảng 3 cho thấy, giống ngô lai CP888 miễn cảm nhất với một, chỉ số miễn cảm với một tương đối là 1.528,041, tiếp đến là mẫu Laocai, Simacai, Luthan và thấp nhất là mẫu Maison (chỉ số miễn cảm với một tương đối là 836,036). Như vậy, trong các mẫu ngô nghiên cứu, mẫu Maison có khả năng kháng một cao nhất. Chúng tôi tiếp tục phân tích đặc điểm của gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nhằm tìm mối liên hệ với đặc tính kháng một của cây ngô.

Tách dòng và xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ các mẫu ngô nghiên cứu

Dựa vào trình tự có mã số JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế, cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1-F*/

ZmDEF1-R đã được thiết kế để khuếch đại đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1* với kích thước ước tính khoảng 0,25 kb.

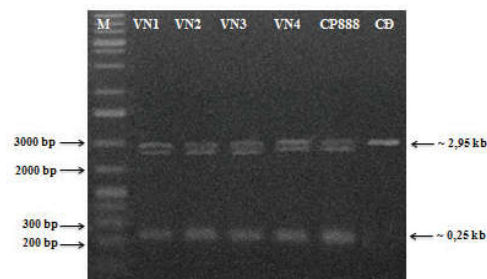
Ở ngô, *ZmDEF1* chỉ được phiên mã ở hạt non và hạt trưởng thành, còn các mô khác thì không hoạt động và hoạt động dưới sự cảm ứng của meja hoặc ABA [8]. Do đó, hạt các mẫu ngô được xử lý ABA, ngâm ủ cho nảy mầm và thu lá sau 5-7 ngày tuổi để tách ARN tổng số. ARN được sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã ngược tạo cADN. Phản ứng PCR nhân bản đoạn mã hóa của gen *ZmDEF1* với cặp mồi đặc hiệu, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose cùng thang ADN chuẩn 1 kb plus được thể hiện ở hình 1.



Hình 1: hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR nhân gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu (M: thang ADN chuẩn 1 kb plus; VN1, VN2, VN3, VN4: các mẫu ngô địa phương; CP888: giống ngô lai)

Kết quả thu được ở hình 1 cho thấy, cả 5 mẫu ngô đều cho sản phẩm PCR với một băng ADN với kích thước ước tính khoảng 0,25 kb, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1* ở ngô mang mã số JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm thu được là gen *ZmDEF1*, chúng tôi tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *ZmDEF1* được công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pBT, sau đó biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và chọn lọc khuẩn lạc trắng bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi M13. Những khuẩn lạc trắng dương tính với colony-PCR có khả năng mang vector tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1*. Sau khi tách plasmid từ sinh khối vi khuẩn, chúng tôi thực hiện kiểm tra sự có mặt của gen *ZmDEF1* bằng cách sử dụng enzyme giới hạn *Bam*HI để cắt plasmid tái tổ hợp (hình 2).



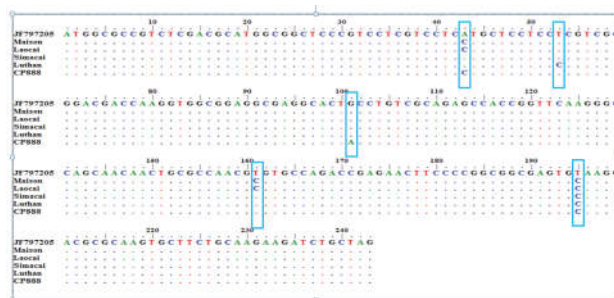
Hình 2: kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp cắt bằng *Bam*HI

(M: thang ADN chuẩn 1 kb plus; VN1, VN2, VN3, VN4, CP888: plasmid tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1* cắt bởi *Bam*HI; DC: plasmid tái tổ hợp pBT-*ZmDEF1* không cắt bởi *Bam*HI)

Theo tính toán lý thuyết, vector pBT có kích thước 2,7 kb, sản phẩm PCR gen đích 0,25 kb thì plasmid tái tổ hợp có kích thước khoảng 2,95 kb. Kết quả điện di kiểm tra (hình 2) cho thấy, các dòng khuẩn lạc trắng dương tính với colony - PCR đều mang plasmid tái tổ hợp (pBT-*ZmDEF1*). Các plasmid tái tổ hợp được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.

Xác định trình tự gen *ZmDEF1* từ mARN các mẫu ngô nghiên cứu

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* phân lập từ mẫu ngô nghiên cứu cho thấy các trình tự gen thu được có kích thước 243 bp (hình 3).

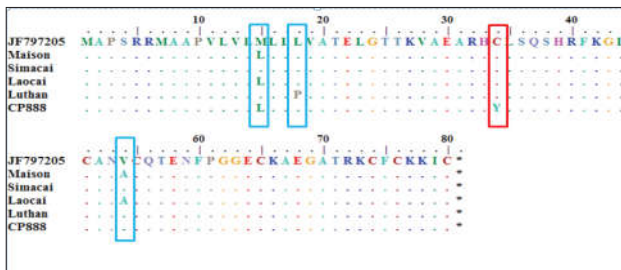


Hình 3: trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu và JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* ở 5 mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (mã số JF797205) có độ tương đồng của các trình tự gen này là 98,8 đến 99,6%, như vậy đã phân lập và tách dòng thành công gen *ZmDEF1* (mARN) từ các mẫu ngô nghiên cứu. Giữa các trình tự gen *defensin1* có 5 vị trí nucleotide sai khác ở các vị trí nucleotide thứ 43, 53, 101, 161 và 195 (hình 3). Trong đó, mẫu Maison và CP888 khác nhau ở vị trí nucleotide thứ 53, 101 và 161. Đặc biệt ở vị trí thứ 101, thuộc bộ ba quy định amino axit thứ 34 của chuỗi polypeptide, ở mẫu Maison là G còn CP888 là A nên rất có thể dẫn đến

sự sai khác amino axit giữa hai trình tự, do đó tiếp tục phân tích trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu. Các trình tự gen *ZmDEF1* của các mẫu Maison, Laocai, Simacai, Luthan và Cp888 đã được đăng trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số LN650982, LN650980, LN650983, LN650981, LN650979. Trong đó, trình tự gen của mẫu Maison được sử dụng để phát triển vector chuyển gen với mục đích tăng cường khả năng kháng một ở ngô.

Trình tự amino axit suy diễn từ gen *ZmDEF1* của các mẫu ngô nghiên cứu và JF797205 đều có 80 amino axit (hình 4). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Baosheng và cs (2011) khi phân lập gen *ZmDEF1* từ giống ngô NongDa108 phục vụ chuyển gen với mục đích kháng nấm [8]. Hình 4 cho thấy, giữa các trình tự nghiên cứu có 4 vị trí amino axit khác nhau ở các vị trí thứ 15, 18, 34, 54 của protein defensin.



Hình 4: trình tự amino axit của defensin1 ở các mẫu nghiên cứu và JF797205 trên Ngân hàng gen quốc tế

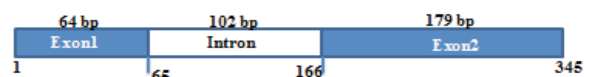
Cấu trúc của defensin thực vật gồm vùng tín hiệu dẫn ở đầu N và vùng chức năng nằm ở đầu C. Vùng chức năng thường chứa từ 45-55 amino axit. Ở ngô, vùng tín hiệu dẫn gồm 31 amino axit, vùng chức năng gồm 49 amino axit. Trong vùng chức năng có chứa 8 phân tử Cys ở các vị trí amino axit thứ 3, 14, 20, 24, 34, 43, 45 và 49, chúng tạo nên 4 cầu disulfide giữa các cặp Cys3 - Cys49, Cys14 - Cys34, Cys20 - Cys43, Cys24 - Cys45 giúp cho sự ổn định cấu trúc không gian của defensin [8]. Cầu nối disulfide giữa các Cys trong vùng chức năng của defensin giữ vai trò quan trọng trong quyết định ức chế α -amylase ở ruột một. Hình 4 cho thấy, trong vùng chức năng của protein suy diễn của các mẫu ngô nghiên cứu có 2 vị trí amino axit sai khác nhau là vị trí 3 và 23. Đặc biệt ở vị trí amino axit thứ 3, các mẫu ngô địa phương Maison, Laocai, Simacai, Luthan và JF797205 đều là Cys để tạo cầu nối disulfide với Cys thứ 49, còn giống ngô lai CP888 thì vị trí thứ 3 này là tyrosine (Y). Vì vậy, trong cấu trúc protein defensin1 của giống ngô lai CP888 sẽ chỉ

có 3 cầu nối disulfide, đặc điểm này có thể liên quan đến tính ổn định của protein và rất có thể làm giảm hoạt tính ức chế α -amylase, tăng tính miễn cảm với một của giống ngô này.

Về không gian ba chiều, defensin gồm 3 phiến gấp β và một chuỗi xoắn α . Trong đó giữa nếp gấp β thứ 2 và thứ 3 có vùng Loop 3, vùng này có chức năng quan trọng trong ức chế hoạt động của α -amylase của một. Do có sự liên kết giữa Loop 3 với trung tâm hoạt động (3 Loop: Loop A, Loop B, Loop C) của α -amylase ở một, đã ngăn cản cơ chất tinh bột đi vào [9]. Sự ức chế này biểu hiện thấp đối với α -amylase của động vật có vú, vì có sự sai khác về độ dài của 3 Loop trung tâm hoạt động của α -amylase của động vật rút ngắn và mở rộng hơn nên Loop 3 của defensin1 không liên kết vào được. Như vậy, có thể ứng dụng biện pháp nâng cao hàm lượng defensin1 trong hạt thực vật nhằm tăng cường khả năng kháng lại côn trùng gây hại ở ngô, lúa gạo và đậu xanh.

So sánh trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN và cADN

Việc so sánh trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN và phân lập từ cADN cho phép tìm ra đặc điểm cấu trúc của gen, đồng thời làm căn cứ để phân tích sự có mặt của gen chuyển trong hệ gen cây ngô chuyển gen. Chúng tôi tiến hành phân lập và giải trình tự gen *ZmDEF1* từ ADN tổng số của mẫu ngô Maison có khả năng kháng một cao nhất, kết quả thu được đoạn ADN có kích thước 345 bp. Trình tự gen *ZmDEF1* phân lập từ ADN của mẫu Maison đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số LN809934. So sánh trình tự gen *ZmDEF1* tách dòng từ cADN với ADN của mẫu ngô Maison, gen có tổng chiều dài 345 bp, cấu tạo gồm 2 exon xen kẽ bởi intron có chiều dài là 102 bp (hình 5).



Hình 5: cấu trúc của gen *ZmDEF1* của mẫu ngô VN1

Phân lập thành công gen *ZmDEF1* từ ADN cho thấy, cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1*-F/*ZmDEF1*-R có thể dùng để phân biệt cây ngô mang gen chuyển với cây không mang gen chuyển *ZmDEF1* bằng phản ứng PCR. Đối với ngô mang gen chuyển, cặp mồi này có thể khuếch đại *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn ADN là 345 bp, đồng thời khuếch đại cả *ZmDEF1* ngoại lai cho kích thước đoạn ADN là 243 bp. Cây không mang gen

chuyển chỉ khuếch đại được một sản phẩm là *ZmDEF1* nội tại cho kích thước đoạn ADN là 345 bp.

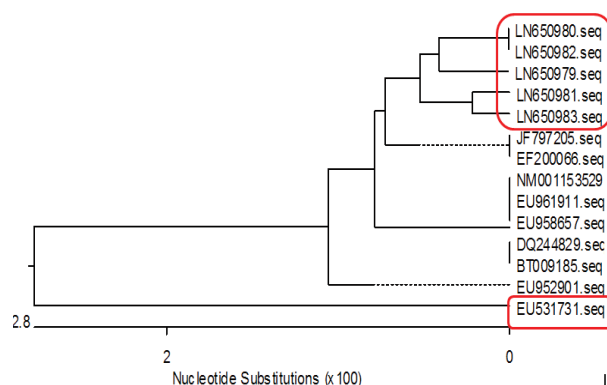
Sự đa dạng về trình tự vùng mã hoá của gen *ZmDEF1* ở cây ngô

Để xác định mức độ đa dạng trong trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1*, chúng tôi thực hiện so sánh vùng mã hoá của gen *ZmDEF1* phân lập từ các giống ngô có mã số trên Ngân hàng gen quốc tế (bảng 4).

Bảng 4: thống kê một số trình tự gen *ZmDEF1* để phân tích đa dạng di truyền

STT	Mã số NCBI	Năm công bố	Vùng phân lập	Tác giả
1	LN650979	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
2	LN650980	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
3	LN650981	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
4	LN650982	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
5	LN650983	2014	Việt Nam	Vi T.X.T và cs
6	NM001153529	2013	Mỹ	Schnable P.S và cs
7	EU531731	2009	Italia	Padovan L và cs
8	EU961911	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
9	EU958657	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
10	EU952901	2008	Mỹ	Alexandrov N.N và cs
11	EF200066	2007	Trung Quốc	Wang B và cs
12	DQ244829	2006	Trung Quốc	Jia J và cs
13	BT009185	2003	Mỹ	Tingey S.V và cs
14	JF797205	2011	Trung Quốc	Wang B.S

Kết quả đánh giá sự đa dạng của trình tự gen *ZmDEF1* của các trình tự nghiên cứu được thể hiện trên sơ đồ hình cây ở hình 6.



Hình 6: sơ đồ hình cây thể hiện sự khác biệt di truyền về trình tự nucleotide đoạn mã hoá của gen *ZmDEF1*

Kết quả hình 6 cho thấy, 14 trình tự vùng mã hóa của gen *ZmDEF1* chia thành 2 nhóm lớn với khoảng cách di truyền là 2,8%. Nhóm lớn thứ nhất gồm 13 trình tự gen và chia thành 4 nhóm nhỏ (nhóm nhỏ thứ nhất gồm các trình gen có quan hệ gần gũi với nhau: LN650982, LN650980, LN650983, LN650981, LN650979 phân lập ở Việt Nam). Nhóm lớn thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một trình tự gen mang mã EU531731 (Italia).

Kết luận

Trong các mẫu ngô nghiên cứu, mẫu Maison có khả năng kháng một cao nhất, thấp nhất là giống ngô lai CP888. Gen *ZmDEF1* phân lập từ mARN của các mẫu ngô địa phương và giống ngô lai CP888 có kích thước là 243 bp mã hóa chuỗi polypeptide dài 80 amino axit. Trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* của các mẫu nghiên cứu có sự sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Trình tự amino axit suy diễn của defensin các mẫu ngô địa phương chứa 8 Cys tạo nên 4 cầu nối disulfide, giống ngô lai CP888 có 7 Cys. Trình tự nucleotide của gen *ZmDEF1* từ ADN có chiều dài 345 bp gồm 2 exon và 1 intron. Trình tự gen *ZmDEF1* thu nhận được từ các mẫu ngô nghiên cứu là cơ sở để tạo vector phục vụ chuyển gen nhằm cải thiện khả năng kháng một ở cây ngô.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành nhờ kinh phí của đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số: B2014-TN06-04. Các tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ từ đề tài và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen (Viện Công nghệ Sinh học).

Tài liệu tham khảo

- [1] Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta J.A, Saucedo-Arias L.J, Gomez-Lim M.A (1999), "The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants", *Nat Biotechnol*, **17**, pp.1223-1226.
- [2] Throne J.E (1994), "Life history of immature maize weevils (*Coleoptera: Curculionidae*) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory", *Environmental Entomology*, **23**, pp.1459-1471.
- [3] Liu Y.J, Cheng C.S, Lai S.M, Hsu M.P, Chen C.S, Lyu P.C (2006), "Solution structure of the plant defensin VrD1 from mungbean and its possible role in insecticidal activity against bruchids", *Proteins*, **63**(4), pp.777-786.
- [4] Pelegrini P.B, Lay F.T, Murad A.M, Anderson M.A, Franco O.L (2008), "Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family", *Proteins*, **73**, pp.719-729.
- [5] Pelegrini P.B, Franco O.L (2005), "Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multifunctional class of defense proteins", *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, pp.2239-2253.
- [6] Hà Quang Hùng (2005), *Giáo trình kiểm dịch thực vật và dịch hại nông sản sau thu hoạch*, NXB Nông nghiệp.
- [7] Sambrook J, Russell D.W (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- [8] Baosheng W, Jingjuan Y, Dengyun Z and Qian Z (2011), "Maize defensin ZmDEF1 is involved in plant response to fungal phytopathogens", *African Journal of Biotechnology*, **10**(72), pp.16128-16137.
- [9] Lin K.F, Lee T.R, Tsai P.H, Hsu M.P, Chen C.S, Lyu P.C (2007), "Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin", *Protein*, **68**, pp.530-540.