

**PHÂN LẬP, NHẬN DIỆN TRÌNH TỰ GEN MADS – BOX TẠO HOA  
Ở HOA THUỐC LÁ *IN VITRO* VÀ *EX VITRO*  
(*NICOTIANA TABACUM* L.CV SAMSUN)**

NGUYỄN NHƯ HOA\*, BÙI VĂN LỆ\*\*

**TÓM TẮT**

*Nghiên cứu này nhằm phân lập, giải trình tự 1 đoạn gen MADS – box tạo hoa ở thuốc lá Nicotiana tabacum L.cv Samsun in vitro và ex vitro, tạo cơ sở để tìm hiểu vai trò của gen này đến quá trình cảm ứng ra hoa invitro. Trình tự phân lập được trong thí nghiệm thuộc họ gen MADS – box loại II, dài 367bp, không chứa vùng MADS – box, từ bp 1 – 87 thuộc vùng I, từ 88 – 297 thuộc K – box và 298 – 367 thuộc vùng C. Thí nghiệm này ban đầu cho thấy sự giống nhau về mặt di truyền giữa hoa in vitro và ex vitro.*

*Từ khóa:* Nicotiana tabacum L.cv Samsun, gen MADS – box, ra hoa invitro, ra hoa ex vitro.

**ABSTRACT**

***Isolating and identifying MADS – box gen of invitro and exvitro tobacco flower  
(Nicotiana tabacum L.cv Samsun)***

*The purpose of this study was to isolate, sequenced a fragment of MADS - box gen in Nicotiana tabacum L.cv Samsun, to understand the role of this gen in in vitro flowering process. The sequence of experiments involves MADS- box type II, 367bp long does not contain the MADS- box, from 1-87 bp in I region, 88-297 in K- box and 298-367 in C region. This experiment initially showed genetic similarity between the in-vitro and ex-vitro flowering.*

*Keywords:* Nicotiana tabacum L.cv Samsun, MADS - box gen, in vitro flowering, ex vitro flowering.

**1. Mở đầu**

Sự ra hoa là bước chuyển quan trọng trong đời sống thực vật, được kiểm soát bởi rất nhiều yếu tố nội sinh và ngoại sinh. Hiện nay, cảm ứng ra hoa trong điều kiện *in vitro* là hướng nghiên cứu khá thú vị, thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước. Trên thế giới, các nhà khoa học đã nghiên cứu ra hoa *in vitro* ở *Murraya paniculata* (L.), *Anethum graveolens*, *Pharbitis nil*, *Dendrocalamus hamiltonii*, *Dendrobium Madame Thong-In*, *Dendrobium Sonia* 17... Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu về lãnh vực này trên *Chrysanthemum* sp., *Dendrobium Sonia*, *Coleogyne* sp., *Arabidopsis thaliana*, *Dianthus caryophyllus* L...

\* ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

\*\* PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

Tuy nhiên, hoa *in vitro* thường không hoàn toàn giống hoa trong điều kiện tự nhiên về hình dạng, màu sắc, kích thước, khả năng thụ phấn... Có giả thuyết cho rằng có thể có sự hiện diện của các hợp chất cản trở sự phát triển bình thường của mô phân sinh hoa trong môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, về mặt di truyền, ở thực vật bậc cao, sự phát triển hoa trải qua một loạt các giai đoạn và chịu tác động của rất nhiều gen điều hòa. Phần lớn các gen này thuộc liên họ MADS-box. MADS là sự kết hợp của 4 chữ cái đầu trong tên của bốn gen (MCM1 ở nấm men, AGAMOUS ở *Arabidopsis*, DEFICIENS ở *Snapdragon*, SRF ở người) có độ tương đồng về trình tự cao. Họ gen MADS – box được xác định bởi hộp MADS là một trình tự DNA bảo tồn cao, dài 180 bp; K-box là domain bảo tồn, có vai trò trong tương tác protein-protein; vùng I nằm giữa domain MADS và domain K, đa dạng, với chiều dài khác nhau; vùng C ít bảo tồn nhất [1]. MADS-box gen đã được cô lập và mô tả đặc điểm ở nhiều loài như *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*, *Betula pendula*... Vì vậy, bước đầu xác định trình tự gen MADS – box ở hoa *in* và *ex vitro* từ đó tìm ra vai trò của gen này trong sự bất thường về hình dạng, cấu tạo... ở hoa *in vitro* là cấp thiết và có ý nghĩa.

## 2. Vật liệu, phương pháp

### 2.1. Đối tượng, vật liệu

#### 2.1.1. Đối tượng

Cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun từ Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

#### 2.1.2. Vật liệu:

- Hoa thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun *in vitro* và *ex vitro* được tạo ra từ những nghiên cứu tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Hóa chất tách chiết RNA tổng số, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) tạo cDNA, primer.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế primer bằng phần mềm AlleleID 7.0 dựa trên trình tự NAP1-1(cDNA của gen MADS-box ở *Nicotianatabacum* var. *xanthi*) được tải về từ ngân hàng gen NCBI.

- Tìm trình tự đã biết vị trí các exon, tương đồng cao với NAP1-1 bằng cách blast các trình tự này với thư viện genomic DNA.
- Sau khi tìm được trình tự mong muốn với vị trí các exon, tiến hành sắp giống cột và so sánh trình tự với NAP1-1 để suy ra vị trí các exon của NAP1-1.
- Đưa trình tự đã chọn và vị trí các exon vào phần mềm AlleleID 7.0, sử dụng các tham số thiết kế mặc định của phần mềm. Kiểm tra, so sánh lại các thông số của primer

như: Tm, chiều dài, cấu trúc kẹp tóc, khả năng hình thành các dạng dimer... để chọn ra 1 cặp primer cho các thí nghiệm tiếp theo.

Primer được tổng hợp bởi IDT ở nồng độ 25µM.

Hoa thuốc lá *in vitro* và *ex vitro* được tách RNA tổng số bằng phương pháp Trizol. Sau đó, xử lí RNA tổng số bằng Turbo DNA – freeTM, tổng hợp cDNA, thiết lập phản ứng PCR.

Giải trình tự 2 mạch bởi MACRO GEN.

Xử lí kết quả sau giải trình tự bằng phần mềm ChromasPro và công cụ BLAST (NCBI).

### 3. Kết quả, thảo luận

#### 3.1. Thiết kế primer

Trình tự được chọn để thiết kế primer là NAP1-1 (dài 1143 bp, AF009126) của *Nicotiana tabacum var. xanthi*. Sau khi tìm ra vị trí các exon, xử lí bằng phần mềm AlleleID 7.0 nhận được cặp primer tương ứng.

**Bảng 1.** Thông số thiết kế của cặp primer

mRNA	Trình tự		Vị trí	Chiều dài bp	Tm °C	GC %	Sản phẩm bp
NAP1-1	Sense	TATTCCAAGTATT CTTCCATGG	366	22	54,8	40,9	384
	Anti-sense	CTGAGTCTGCTGA GCTAGC	749	19	55,1	57,9	

Các thông số của cặp primer thể hiện trong bảng 1 cho thấy không có bất kì sự hiện diện nào của cấu trúc kẹp tóc hay các cấu trúc hình thành do sự bắt cặp giữa môi xuôi và môi ngược (Cross – dimer), sự tự bắt cặp của môi (Self – dimer).

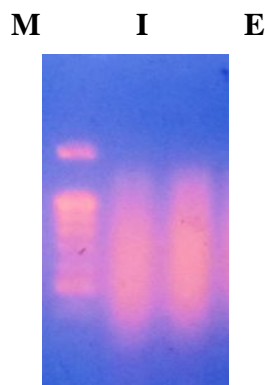
Kết quả primer :H1: Sense: 5’-TATTCCAAGTATTCTTGCATGG-3’

H2: Anti-sense: 5’-CTGAGTCTGCTGAGCTAGC-3’

Sản phẩm PCR khoảng 384 bp.

#### 3.2. Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số sau khi tách chiết được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch bằng máy Nano Drop (bảng 2). Tỷ lệ OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> của hai mẫu nằm trong khoảng 1,8 – 2,0, do đó RNA tổng số thu được là tinh sạch. Nồng độ RNA tổng số ở các mẫu này không cao, tuy nhiên vẫn là nồng độ cho phép sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 1.** Kết quả điện di RNA tổng số từ các mẫu in vitro và ex vitro trên gel 2% agarose

M: thang chuẩn (100bp plus blue DNA ladder/GeneON)

**Bảng 2.** Kết quả định lượng RNA tổng số bằng Nano Drop

Mẫu	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Nồng độ ng/μl
I (in vitro)	1,88	326,9
E (ex vitro)	1,88	347,3

### 3.3. RT-PCR tạo cDNA, PCR đoạn gen mục tiêu

Sau khi tạo cDNA, 1 đoạn gen MADS – box tạo hoa ở thuốc lá được thu nhận bằng phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu H1, H2. Sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2% , là một băng đặc hiệu, có độ dài khoảng 300 – 400 bp đúng như dự tính.



**Hình 2.** Kết quả điện di cDNA trên gel 2% agarose

M: thang chuẩn (100bp plus blue DNA ladder/GeneON)

### 3.4. Giải trình tự

Kết quả giải trình tự sau khi xử lí bằng phần mềm ChromasPro:

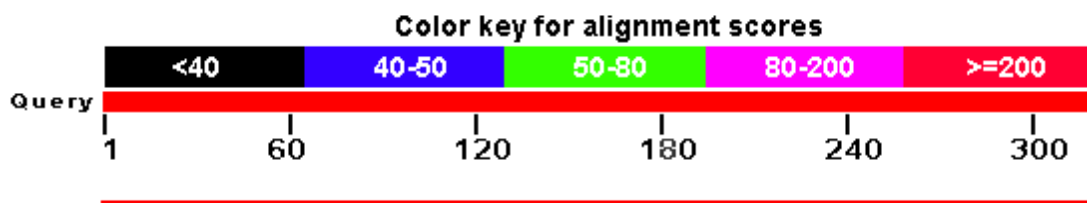
Trình tự ở mẫu I có độ dài 322 bp

```
CATATGCTGAGAGGCAGCTTACTGCTACTGATCATGAAACCCCGGGG
AGCTGGACTTTGGAACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAA
AGAAACCAAAGGCATTATGCAGGAGAAGATTTGGACTCATTAAAGTATGAA
AGAGCTTCAGAATCTTGAGCACCAGCTCGATTCTGCTCTTAAGCACATTCG
ATCAAGAAAGAATCAATTGATGCATGAATCCATTTCTGAGCTGCAAAGAA
GGACAAGGCATTGCAAGAGCAAAACAACAATCTCTCAAAGCAGGTGAAAG
AAAGGGAGAAAGAGCTAGCTCA
```

Trình tự ở mẫu E có độ dài 367 bp

```
TGATTCTTGCATGGAAAGGATTCTTGAAAGGTATGAAAGGTACTCATA
TGCTGAGAGGCAGCTTACTGCTACTGATCATGAAACCCCGGGGAGCTGGAC
TTTGAACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAAAGAAACCA
AAGGCATTATGCAGGAGAAGATTTGGACTCATTAAAGTATGAAAGAGCTTCA
GAATCTTGAGCACCAGCTCGATTCTGCTCTTAAGCACATTCGATCAAGAAA
GAATCAATTGATGCATGAATCCATTTCTGAGCTGCAAAGAAAGGACAAGGC
ATTGCAAGAGCAAAACAACAATCTCTCAAAGCAGGTGAAAGAAAGGGAGA
AAGAGCTAGCTCAG
```

Sau khi dùng công cụ blast trên NCBI so sánh 2 trình tự, ta có thể kết luận 2 trình tự này hoàn toàn không khác biệt (trình tự ở mẫu I chính là 1 phần trình tự ở mẫu E) và đây chính là trình tự cần phân lập.



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
595 bits(322)	5e-175	322/322(100%)	0/322(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATATGCTGAGAGGCAGCTTACTGCTACTGATCATGAAACCCCGGGGAGCTGGACTTTGG	60		
Sbjct 45	CATATGCTGAGAGGCAGCTTACTGCTACTGATCATGAAACCCCGGGGAGCTGGACTTTGG	10		
Query 61	AACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAAAGAAACCAAAGGCATTATGCAG	12		
Sbjct 105	AACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAAAGAAACCAAAGGCATTATGCAG	16		
Query 121	GAGAAGATTTGGACTCATTAAAGTATGAAAGAGCTTCAGAATCTTGAGCACCAGCTCGATT	18		
Sbjct 165	GAGAAGATTTGGACTCATTAAAGTATGAAAGAGCTTCAGAATCTTGAGCACCAGCTCGATT	22		
Query 181	CTGCTCTTAAGCACATTCGATCAAGAAAGAATCAATTGATGCATGAATCCATTTCTGAGC	24		
Sbjct 225	CTGCTCTTAAGCACATTCGATCAAGAAAGAATCAATTGATGCATGAATCCATTTCTGAGC	28		
Query 241	TGCAAAAGAAGGACAAGGCATTGCAAGAGCAAAACAACAATCTCTCAAAGCAGGTGAAAG	30		
Sbjct 285	TGCAAAAGAAGGACAAGGCATTGCAAGAGCAAAACAACAATCTCTCAAAGCAGGTGAAAG	34		
Query 301	AAAGGGAGAAAGAGCTAGCTCA	322		
Sbjct 345	AAAGGGAGAAAGAGCTAGCTCA	366		

Hình 3. Kết quả blast trình tự ở mẫu I và trình tự ở mẫu E

Khi tiến hành blast trình tự ở mẫu E với vùng MADS – box và K – box của NAP1-1 nhận thấy ở trình tự này không chứa vùng MADS – box, trình tự từ bp 1 – 87 thuộc vùng I, từ 88 – 297 thuộc K – box và 298 – 367 thuộc vùng C.

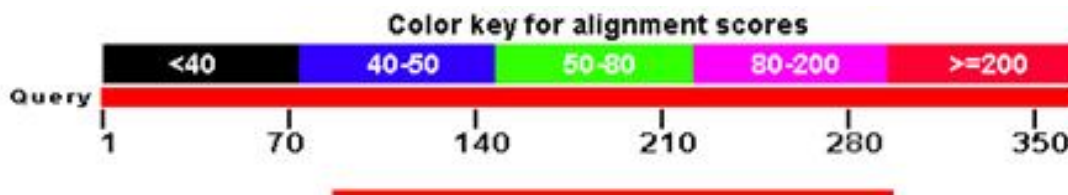
Blast 2 sequences

Nucleotide Sequence (367 letters)

<p>Query ID  cd 53627</p> <p>Description  None</p> <p>Molecule type  nucleic acid</p> <p>Query Length  367</p>	<p>Subject ID  53629</p> <p>Description  None</p> <p>Molecule type  nucleic acid</p> <p>Subject Length  180</p> <p>Program  BLASTN 2.2.27+</p>
--	--

[No significant similarity found. For reasons why, click here](#)

Hình 4. Kết quả blast trình tự ở mẫu E với vùng MADS – box của gen NAP1-1



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
361 bits(195)	1e-104	205/210(98%)	0/210(0%)	Plus/Plus
Query 88	GGGGAGCTGGACTTTGGAACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAAAGAAA	147		
Sbjct 1	GGGGAGCTGGACTTTGGAACATGCTAAGCTTAAGGCCAGACTTGAGGTTTTGCAAAGAAA	60		
Query 148	CCAAAGGCATTATGCAGGAGAAGATTTGGACTCATTAAAGTATGAAAGAGCTTCAGAATCT	207		
Sbjct 61	CCAGGGGCATTATGCAGGAGAAGATTTGGACTCATTATGTATGAAAGAGCTTCAGAATCT	120		
Query 208	TGAGCACCAGCTCGATTCTGCTCTTAAGCACATTTCGATCAAGAAAGAATCAATTGATGCA	267		
Sbjct 121	TGAGCACCAGCTCGATTCTGCTCTTAAGCACATTTCGATCAAGAAAGAATCAATTGATGCA	180		
Query 268	TGAATCCATTTCTGAGCTGCAAAAAGAAGGA	297		
Sbjct 181	TGAATCCATTTCTGAGCTGCAAAAAGAAGGA	210		

**Hình 5.** Kết quả blast trình tự ở mẫu E với vùng K – box của gen *NAP1-1*

Từ những phân tích trên ta có thể thấy đoạn gen MADS – box ở hoa *in vitro* và *ex vitro* trong thí nghiệm là giống nhau. Các gen MADS – box đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển hoa, bao gồm cả việc xác định vị trí mô phân sinh hoa và các cơ quan hoa (Ma 1994; Weigel và Meyerowitz 1994). [1]

Ngoài ra, kết quả blast trình tự ở mẫu E với ngân hàng gen cho thấy trình tự này giống cDNA *Ntsqua12* là 99%, cDNA *NAP1-1* là 98%. cDNA *NAP1-1* và *NAP1-2* được giải trình tự ở *Nicotiana tabacum var. xanthi* thuộc họ gen MADS – box, giống với cDNA *SQUA* ở *Snapdragon*, cDNA *PGF* ở dã yên thảo (*Petunia*), cDNA *API* ở *Arabidopsis* [2]. Như vậy, có thể kết luận trình tự phân lập được trong thí nghiệm thuộc họ gen MADS – box loại II, dài 367bp, không chứa vùng MADS – box, từ bp 1 – 87 thuộc vùng I, từ 88 – 297 thuộc K – box và 298 – 367 thuộc vùng C.

#### 4. Kết luận, kiến nghị

Như vậy, nghiên cứu đã giải trình tự 1 đoạn gen thuộc họ gen MADS – box loại II, dài 367bp, không chứa vùng MADS – box, từ bp 1 – 87 thuộc vùng I, từ 88 – 297 thuộc K – box và 298 – 367 thuộc vùng C.

Thí nghiệm này ban đầu cho thấy sự giống nhau về mặt di truyền giữa hoa *in vitro* và *ex vitro*. Từ đó, có thể thấy triển vọng tạo hoa *in vitro* đại trà, ứng dụng trong việc kiểm soát sự ra hoa của cây ở điều kiện *ex vitro*, cải tiến và lai tạo giống trong điều kiện *in vitro*, nghiên cứu sự ra hoa *in vitro* về sinh lí, sinh hóa thay vì *ex vitro*...

Cần tiếp tục nghiên cứu biểu hiện của gen MADS-box tạo hoa ở các mức độ khác nhau để xác định cụ thể vai trò của gen này trong sự bất thường ở hoa *in vitro*.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Beverley, J.G. (2007), *Understanding of flowers and flowering*, Oxford University Press Inc., New York, The United States of America.
2. Seonghoe Jang (2002), *Characterization of tobacco MADS-box genes involved in floral initiation*, Plant cell physiol. 43(1): 230-238.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 25-6-2013; ngày phản biện đánh giá: 31-7-2013;  
ngày chấp nhận đăng: 16-5-2014)