

ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ NUCEOTIDE CỦA CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR TRONG GEN MÃ HÓA SUCROSE SYNTHASE PHÂN LẬP TỪ GIỐNG CHÈ TRUNG DU XANH VÀ TRUNG DU TÍM

Hoàng Thị Thu Yên*, Dương Thị Hiền
Trường Đại học khoa học - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Chỉ thị SSR (single sequence repeat-SSR) có nguồn gốc từ cDNA/EST có ưu điểm giảm chi phí và thời gian xây dựng chỉ thị do các đoạn cDNA/EST liên quan trực tiếp đến các gen chức năng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập, xác định và phân tích trình tự nucleotide chỉ thị SSR của gen mã hóa sucrose synthase - enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp sucrose làm cơ sở nghiên cứu chỉ thị phân tử ứng dụng trong chọn tạo giống chè. Motif TTGTT thuộc đầu 3'UTR (Untranslated region) của gen mã hóa sucrose synthase được lặp lại trong hai mẫu nghiên cứu thuộc nhóm gián đoạn bởi một vài base không thuộc cấu trúc motif, trình tự motif thu được tương ứng ở chè Trung du xanh và Trung du tím lần lượt là: (TTGTT)₄ GTT (TTGTT)₄; (TTGTT)₆ GTT (TTGTT)₃; (TTGTT)₅ GTT (TTGTT). So sánh trình tự motif TTGTT của gen mã hóa sucrose synthase với các trình tự đã công bố cho thấy, motif TTGTT có thể có tính bảo thủ trong giống và tính đa hình cao giữa các giống chè phân tích.

Từ khóa: Cây chè; *Camellia sinensis*; đa dạng di truyền; SSR; microsatellite; sucrose synthase

Ngày nhận bài: 04/6/2020; Ngày hoàn thiện: 28/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

CHARACTERISTICS OF NUCLEOTIDE SEQUENCE OF SSR MARKER IN GENE CODED SUCROSE SYNTHASE FROM GREEN AND PURPLE TRUNG DU TEA VARIETIES

Hoang Thi Thu Yen*, Duong Thi Hien
TNU - University of Sciences

ABSTRACT

cDNA/EST - derived SSR markers (single sequence repeat-SSR) has the advantage of reducing the cost and time of directing the marker because cDNA/EST fragments are directly related to functional genes. In this study, we conducted an analysis of the nucleotide sequence of SSR marker of the gene encoding sucrose synthase - the enzyme involved in sucrose synthesis as a basis for molecular markers applied in tea breeding. Motif TTGTT belongs to 3' UTR (untranslated region) of the gene encoding sucrose synthase was repeated in two samples of the interrupted group by a few bases that are not motif structure, the motif sequence obtained in green and purple Trung du tea, respectively: (TTGTT) 4 GTT (TTGTT) 4; (TTGTT) 6 GTT (TTGTT) 3; (TTGTT) 5 GTT (TTGTT). Comparing the TTGTT sequence of the sucrose synthase encoding gene with the published sequences shows that the TTGTT motif has a conservative in varieties and a high polymorphism among the analyzed tea varieties.

Keywords: Tea; *Camellia sinensis*; genetics diversity; SSR; microsatellite; sucrose synthase

Received: 04/6/2020; Revised: 28/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. Email: yenhtt@tnus.edu.vn

1. Mở đầu

SSR (single sequence repeat-SSR) là những đoạn trình tự DNA được lặp lại liên tiếp với những nucleotide motif ngắn (1-6 bp), tùy từng loài mà số lượng nucleotide trong mỗi đơn vị lại có thể thay đổi từ một đến hàng chục và số lượng đơn vị lặp lại có thể biến động từ 2 đến hàng nghìn. Trình tự SSR được xác định từ trình tự DNA genome và cDNA/EST (EST-Expression Sequence Tag). Chỉ thị SSR có nguồn gốc từ cDNA/EST có ưu điểm giảm chi phí và thời gian xây dựng chỉ thị do các đoạn cDNA/EST liên quan trực tiếp đến các gen chức năng, vì vậy chỉ thị SSR phát triển từ nguồn dữ liệu này có ích hơn [1]. Khi so sánh các đoạn EST ở chè với các gen đã biết chức năng từ các loài khác cho thấy hầu hết các chỉ thị SSR-EST liên quan đến các quá trình sinh học, thành phần cấu tạo tế bào và chức năng phân tử của gen ở chè [1]-[5]. Tuy nhiên, mối liên quan của các chỉ thị SSR-EST với các gen thực hiện các chức năng này ở chè vẫn chưa được nghiên cứu. Các nghiên cứu chỉ thị SSR ở chè trồng tại Việt Nam còn hạn chế. Năm 2009, Trần Đức Trung và đồng tác giả (đtg) đã nghiên cứu đánh giá sự đa dạng di truyền 96 giống/dòng chè trồng ở Việt Nam bằng kỹ thuật PCR-SSR [6]. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá đa dạng hệ gen của 18 giống chè trồng tại Thái Nguyên dựa vào 14 chỉ thị SSR và phân tích trình tự nucleotide đoạn SSR mã hóa cho protein chức năng ở một số giống chè dựa trên khuôn DNA hệ gen [7].

Sucrose là sản phẩm chính của quá trình quang hợp, có vai trò bổ sung năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật cũng như các sinh vật sống. Sucrose tích lũy phần lớn ở các mô thực vật, giúp cho thực vật thích nghi tốt với các điều kiện bất lợi của môi trường như: hạn, lạnh, mặn, và cường độ ánh sáng mạnh,... Sucrose được chuyển hóa nhờ invertase hoặc sucrose synthase (EC 2.4.1.13). Trong khi invertase xúc tác quá trình thủy phân sucrose không thể đảo ngược

thành các glucose và fructose, sucrose synthase xúc tác sự phân cắt thuận nghịch của sucrose bằng cách sử dụng uridine diphosphate (UDP) để tạo ra fructose và UDP - glucose (UDP-G) [8]. Hàm lượng sucrose trong lá chè chiếm không quá 1% khối lượng chất khô và có ảnh hưởng tới chất lượng sản phẩm chè như hương thơm, độ ngọt [9]; [10]. Ở chè, đoạn SSR của gen mã hóa cho enzyme tổng hợp sucrose đã được nghiên cứu bởi Ma và đtg (2010) [2], trình tự mRNA mã hóa cho sucrose synthase chứa đoạn SSR đã được công bố trên Genbank với mã số KF921302 và XM_028214197.

Hiện nay, Việt Nam là một trong 10 quốc gia đứng đầu thế giới về diện tích và sản lượng chè. Các giống chè được trồng chủ yếu là chè Trung du, chè Shan và các giống chè mới, có nhiều giống chè được nhập nội từ các nước như Trung Quốc, Nhật Bản, Sri Lanka... Giống chè Trung du gồm Trung du búp xanh và Trung du búp tím (Trung du xanh và Trung du tím), từ lâu đã được coi là khởi thủy của cây chè Việt Nam. Chè Trung du được biết đến có vị thơm, ngọt hậu, nhiều người ưa chuộng. Ngoài ra, chè Trung du có khả năng chống chịu sâu bệnh cũng như chịu hạn, chịu rét tốt ở vụ đông, chè có giá trị kinh tế cao; khả năng sinh trưởng mạnh, độ che phủ lớn, có thể chống xói mòn và rửa trôi, bảo vệ môi trường sinh thái. Tuy nhiên, do được trồng đã nhiều năm, nên chè Trung du dần bị thoái hóa, năng suất và chất lượng thấp [9]; [10]. Đã có nhiều công trình nghiên cứu cải tạo, bảo tồn và phát triển giống chè Trung du, đặc biệt là giống chè Trung du tím được cho là chè đặc sản, quý hiếm, có khả năng chữa bệnh rất cao [11]-[13]. Trên cơ sở chè Trung du được đánh giá cảm quan để lại vị ngọt hơn so với các giống khác sau khi uống và để góp phần tìm kiếm chỉ thị phân tử có tiềm năng ứng dụng trong chọn tạo giống chè, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trình tự nucleotide chỉ thị SSR của gen mã hóa sucrose synthase ở chè Trung du xanh và chè Trung du tím.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Sử dụng lá của giống chè Trung du xanh và Trung du tím được cung cấp bởi TS. Dương Trung Dũng, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

Phương pháp tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA được thực hiện theo mô tả của Hoàng Thị Thu Yến và đtg [14].

2.2.2. Kỹ thuật PCR

Cặp mồi sử dụng trong kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase dựa trên cơ sở dữ liệu mồi đã công bố của Ma và đtg (2010) [2] (F: AGTTGGCTGAATCAGTCCCTT; R: GCTTAAATCACAATTCAAAGC). Kỹ thuật PCR được thực hiện trong 50 µl thể tích với các thành phần: 25 µl master mix (Qiagen), 2,0 µl mồi F (10 mM), 2,0 µl mồi R (10 mM), 4 µl cDNA (40 ng/µl); 17 µl H₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng là: 94°C trong 3 phút, (94°C trong 30 giây, 48°C trong 45 giây,

72°C trong 45 giây) lặp lại 32 chu kỳ, 72°C trong 10 phút và lưu giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2%.

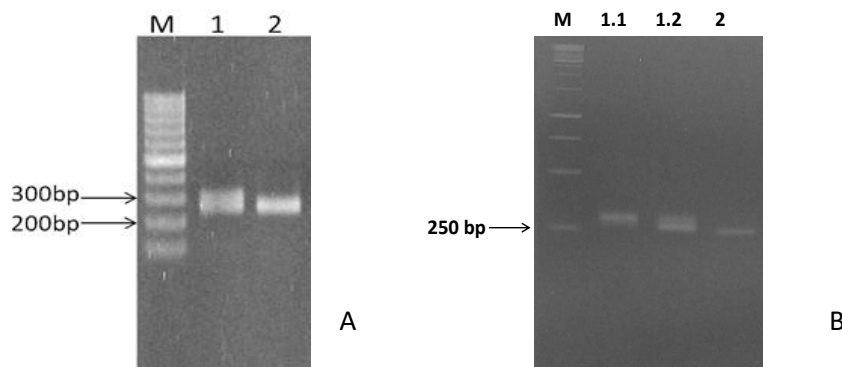
2.2.3. Xác định và phân tích trình tự đoạn SSR

Sản phẩm PCR-SSR tinh sạch được xác định trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kết quả trình tự gen được phân tích, so sánh bằng phần mềm sinh học chuyên dụng (BLAST, Bioedit).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khuếch đại đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase ở chè Trung du xanh và Trung du tím

Motif lặp TTGTT của đoạn SSR thuộc đầu 3' UTR (untranslated region - UTR) của gen mã hóa sucrose synthase được khuếch đại sử dụng khuôn cDNA từ RNA tổng số mẫu chè Trung Du xanh và Trung Du tím với cặp mồi dựa trên trình tự đã công bố (KF921302, XM_028214197) [2]. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 2%, kết quả thu được thể hiện trên hình 1A.



Hình 1. Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase từ chè Trung Du xanh và Trung Du tím

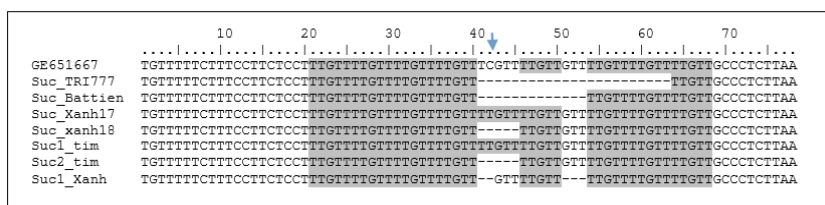
A - Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase (M: Marker DNA 100bp (Thermo Scientific); 1: sản phẩm PCR khuếch đại đoạn SSR từ mẫu chè Trung du tím 2: sản phẩm PCR khuếch đại đoạn SSR từ mẫu chè Trung du xanh. B - Hình ảnh kiểm tra tinh sạch sản phẩm PCR khuếch đại đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase (M: Marker DNA 1 kb (Thermo Scientific); 1.1; 1.2 và 2: sản phẩm PCR tương ứng ở giống chè Trung Du tím và Trung du xanh

Kết quả ở hình 1A cho thấy, sản phẩm PCR đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase thu được ở cả 2 mẫu nghiên cứu đều có kích thước khoảng ~300 bp, kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương tự với nghiên cứu đã công bố trước đây, khoảng 260-275 bp (KF921302,

XM_028214197) [2]. Sản phẩm PCR từ chè Trung du xanh thu được một băng đặc hiệu, trong khi sản phẩm PCR từ mẫu chè Trung du tím có 2 băng DNA. Chúng tôi, ký hiệu đoạn SSR mã hóa sucrose synthase từ chè Trung Du xanh là Suc1_xanh; còn đoạn SSR từ chè Trung Du tím tương ứng là Suc1_tím và Suc2_tím. Tiếp theo, sản phẩm PCR được tinh sạch phục vụ mục đích xác định và phân tích trình tự, kết quả tinh sạch được thể hiện trên hình 1B.

I CCT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT GTT TTGTT TTGTT TTGTT GCCC
 II CCT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT GTT TTGTT TTGTT TTGTT GCCC
 III CCT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT TTGTT GTT TTGTT TTGTT TTGTT GCCC

Hình 2. Motif lặp (TTGTT) của Suc1_xanh (I) và của đoạn Suc1_tím (II) và Suc2_tím (III)



Hình 3. Sự sai khác trình tự nucleotide đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase giữa mẫu nghiên cứu và các trình tự đã công bố, phần trình tự nền xám là trình tự motif TTGTT

3.2. Xác định trình tự nucleotide đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase ở chè Trung du xanh và Trung du tím

Từ kết quả xác định trình tự trực tiếp đoạn SSR của sản phẩm PCR, chúng tôi sử dụng phần mềm Blast để nhận diện và BioEdit để thu nhận đoạn trình tự SSR mã hóa sucrose synthase từ 2 mẫu chè nghiên cứu. Kết quả cho thấy, đoạn Suc1_xanh và Suc2_tím có kích thước 196 bp, đoạn Suc1_tím có kích thước 201 bp. Sự khác biệt về kích thước giữa các đoạn SSR thu được từ 2 mẫu chè nghiên cứu là do sự khác biệt đoạn trình tự lặp lại TTGTT. Motif TTGTT của gen mã hóa sucrose synthase được lặp lại trong hai mẫu nghiên cứu thuộc nhóm gián đoạn bởi một vài base không thuộc cấu trúc motif, đoạn Suc1_xanh có motif lặp ở là (TTGTT)₄ GTT (TTGTT)₄; motif lặp ở đoạn Suc1_tím và Suc2_tím lần lượt là: (TTGTT)₆ GTT (TTGTT)₃; (TTGTT)₅ GTT (TTGTT)₃ (Hình 2).

3.3. Phân tích trình tự nucleotide đoạn SSR mã hóa sucrose synthase ở chè Trung du xanh và Trung du tím

Để chỉ ra sự sai khác trình tự nucleotide đoạn SSR giữa các mẫu nghiên cứu với các trình tự đã công bố [2], chúng tôi đã tiến hành so sánh

trình tự motif lặp TTGTT của đoạn SSR mã hóa sucrose synthase từ 2 mẫu chè nghiên cứu với các trình tự đã công bố bằng cách sử dụng phần mềm sinh học phân tử BioEdit. Kết quả so sánh được thể hiện ở hình 3.

Kết quả từ hình 3 cho thấy, sự khác nhau về motif TTGTT lặp lại giữa các mẫu chè phân tích, các vùng trình tự hai bên motif lặp không có sự sai khác. So sánh motif lặp TTGTT của mẫu chè nghiên cứu với các mẫu chè đã công bố cho thấy, motif tồn tại ở cả hai dạng, lặp lại gián đoạn và liên tục. Motif TTGTT được lặp lại liên tục ở mẫu chè TRI777 – giống chè có nguồn gốc từ chè shan (Suc_TRI7770 và chè Bát tiên (Suc_battien) một giống nhập nội từ Trung Quốc, tương ứng là (TTGTT)₅ và (TTGTT)₇. Hai mẫu chè nghiên cứu và tất cả các mẫu chè Việt Nam đã công bố đều có motif TTGTT bị gián đoạn bởi nucleotide GTT, chè Trung du xanh dòng 17 và Suc1_tím: (TTGTT)₆(GTT)(TTGTT)₃, chè Trung du xanh dòng 18 và Suc2_tím: (TTGTT)₅GTT(TTGTT)₃, Suc1_xanh: (TTGTT)₄(GTT)(TTGTT)₄. Motif TTGTT ở mẫu chè của Trung Quốc công bố trên Genbank (GE651667) là: (TTGTT)₄TCGTT(TTGTT)₁GTT(TTGTT)₃.

Tuy nhiên, ở vị trí nucleotide 42, 2 mẫu chè Việt Nam có cấu trúc motif lặp lại tương tự đều là T thay thế C có trong trình tự đoạn SSR được công bố (GE651667). Như vậy, motif lặp lại TTGTT thuộc vùng 3' UTR của gen mã hóa sucrose synthase có tính đa hình giữa các giống chè phân tích, nhưng có thể có sự bảo thủ trong cùng một giống. Để xác định motif TTGTT lặp lại có ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen mã hóa sucrose synthase như thế nào và có ảnh hưởng đến hàm lượng sucrose hay không rõ ràng cần có những nghiên cứu bổ sung khác.

4. Kết luận

Trình tự đoạn SSR của gen mã hóa sucrose synthase từ chè Trung du xanh và Trung du tím có các vùng trình tự hai bên bảo thủ và có motif lặp thuộc dạng gián đoạn bởi nucleotide GTT không thuộc cấu trúc motif. Motif TTGTT của gen mã hóa sucrose synthase có thể có tính bảo thủ trong giống và tính đa hình cao giữa các giống chè nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. J. Sahu, R. Sarmah, B. Dehury, K. Sarma, S. Sahoo, M. Sahu, M. Barooah, M. K. Modi, and P. Sen, "Mining for SSRs and FDMs from expressed sequence tags of *Camellia sinensis*," *Bioinformatics*, vol. 8, no. 6, pp. 260-266, 2012.
- [2]. J. Q. Ma, Y. H. Zhou, C. L. Ma, M. Z. Yao, J. Q. Jin, X. C. Wang, and L. Chen, "Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae)," *American Journal of Botany*, vol. 97, no. 12, pp. 153-156, 2010.
- [3]. H. Sharma, R. Kumar, V. Sharma, V. Kumar, P. Bhardwaj, P. S. Ahuja, and R. K. Sharma, "Identification and cross-species transferability of 112 novel unigene-derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis*)," *American Journal of Botany*, vol. 98, no. 6, pp. 133-138, 2009.
- [4]. F. Taniguchi, H. Fukuoka, and J. Tanaka, "Expressed sequence tags from organ-specific cDNA libraries of tea (*Camellia sinensis*) and polymorphisms and transferability of EST-SSRs across *Camellia* species," *Breeding Science*, vol. 62, no. 2, pp. 186-195, 2012.
- [5]. Y. C. Zhao, R. Fu, C. H. Mo, and M. H. Li, "Degradation dynamics of DDT in contaminated soil using laccase," *Environmental Chemistry*, vol. 27, pp. 476-480, 2008.
- [6]. D. T. Tran, T. N. La, T. T. T. Le, and V. T. Nguyen, "Study on genetic diversity by molecular markers of tea varieties in Vietnam," *Journal of agriculture & rural development*, no. 4, pp. 9-13, 2009.
- [7]. T. T. Y. Hoang, T. N. Duong, T. T. H. Ha, B. V. Le, and H. H. Nguyen, "Investigation SSR marker from teas (*Camellia sinensis*) growing in Thai Nguyen province," *Journal of Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 68-79, 2017.
- [8]. O. Stein, and D. Granot, "An Overview of Sucrose Synthases in Plants," *Front Plant Science*, vol. 10, p. 95, 2019.
- [9]. N. Q. Do, and T. K. Le, *Textbook of tea production, processing and consumption*. Agriculture Publishing House, Ha Noi, 2000.
- [10]. V. V. Luong, H. T. Pham, and H. V. Le, *Technology of green tea production and processing*. Agriculture Publishing House, Ha Noi, 2013.
- [11]. V. Dinh, "Purple Trung du tea and conservation concern. Phu Tho: Phu Tho electricity newspaper", 2012. [Online]. Available: <http://baophutho.vn/phong-su-ghi-chep/201206/che-tim-trung-du-va-noi-lo-bao-ton-54584>. [Accessed Feb. 28, 2020].
- [12]. Quan Trang, "Conservation and promoting the value of Trung du tea 2019. Ha Noi: Viet Nam news agency", 2019 [Online]. Available: <https://baotintuc.vn/kinh-te/bao-ton-va-phat-huy-gia-tri-che-trung-du20190127092426874.htm>. [Accessed Feb. 26, 2020].
- [13]. Vi Van, "Improving productivity and quality of Trung du tea. Thai Nguyen: Thai Nguyen electricity newspaper", 2015. [Online]. Available: <http://baothainguyen.org.vn/tintuc/khoa-hoc-cn/nang-cao-nang-suat-chat-luong-che-trung-du-232470-99.html>. [Accessed Feb. 15, 2020].
- [14]. T. T. Y. Hoang, T. H. T. Mai, T. H. Pham, and T. T. H. Huynh, "Cloning and sequence analysis of gene encoding flavonol synthase from Trung du teas growing in Thai Nguyen," *Journal of science, Vietnam national university*, vol. 33, no. 4, pp. 127-136, 2017.