

PHÂN LẬP GEN 4CL1 TỪ CÂY THÔNG ĐUÔI NGỰA (*PINUS MASSONIANA* LAMB.) TRỒNG TẠI VIỆT NAM

Hà Văn Huân¹, Hồ Văn Giảng¹, Nguyễn Như Ngọc¹, Bùi Văn Thắng¹, Nông Văn Hải², Chu Hoàng Hà²

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Nhằm tạo nguồn vật liệu phục vụ cho tạo giống cây lâm nghiệp biến đổi gen có chất lượng gỗ tốt, chúng tôi đã tiến hành phân lập gen 4CL1 từ đối tượng Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.) trồng tại Việt Nam. Tách chiết mRNA tổng số từ tầng xylem thứ cấp của cây Thông đuôi ngựa sử dụng làm khuôn để tổng hợp cDNA sợi đơn. Gen 4CL1 được nhân lên bằng kỹ thuật PCR từ cDNA sợi đơn nhờ cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen 4CL1 ở cây Thông lữ (*Pinus taeda*) đã được công bố trên Ngân hàng gen (mã số PTUI2012). Sản phẩm PCR nhân gen 4CL1 từ cDNA sợi đơn được tách dòng nhờ vector tách dòng pCR2.1 của hãng Invitrogen. Các dòng tế bào chứa plasmid tái tổ hợp mang gen quan tâm được sàng lọc bằng các kỹ thuật như: nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, tách chiết plasmid, cắt kiểm tra plasmid bằng enzyme hạn chế và giải trình tự nucleotide. Phân tích trình tự nucleotide của gen 4CL1 cho thấy toàn bộ vùng khung đọc (ORF) mang mã di truyền gồm 1614 nucleotide. So sánh trình tự nucleotide của gen 4CL1 ở cây Thông đuôi ngựa và cây Thông lữ có tỷ lệ tương đồng 98%, trình tự amino acid tương đồng 99%. Trình tự nucleotide của gen 4CL1 mà chúng tôi phân lập được từ cây Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.) đã được đăng ký trên Ngân hàng gen (mã số FJ810495).

Từ khóa: Cải thiện chất lượng gỗ, gen 4CL, lignin, Thông đuôi ngựa, 4-coumarate:coenzyme A ligase

GIỚI THIỆU

Hiện nay, các nghiên cứu về cải thiện chất lượng gỗ cây lâm nghiệp thường được tiến hành theo hai hướng chính: tăng hàm lượng lignin cho mục tiêu lấy gỗ làm đồ mộc, thủ công mỹ nghệ, xây dựng... và làm giảm hàm lượng lignin cho mục tiêu lấy gỗ làm nguyên liệu cho công nghiệp bột giấy và sợi (Cukovic *et al.*, 2001). Như vậy, việc tạo giống cây trồng lâm nghiệp biến đổi gen theo hướng làm tăng hay giảm lignin là phụ thuộc vào mục tiêu sử dụng gỗ nguyên liệu. Cả hai hướng nghiên cứu đều tập trung tác động vào các gen mã hóa cho các enzyme chìa khóa có liên quan đến sinh tổng hợp lignin.

Gen 4CL1 mã hóa cho 4-coumarate:coenzyme A ligase là enzyme chìa khóa có vai trò đặc biệt quan trọng cho sinh tổng hợp các hợp chất thứ sinh, đặc biệt là lignin ở thực vật (Kumar *et al.*, 2003). Lignin là hợp chất polymer thơm, tham gia vào cấu trúc thành tế bào, đặc biệt là các tế bào của mạch xylem (Lu *et al.*, 2003). Trong tế bào thực vật, lignin có vai trò gắn kết các sợi polysaccharide thông qua các kiểu liên kết hóa học khác nhau, giữ cho thành tế bào vững chắc, nâng cao khả năng chịu lực cơ học và bảo vệ các sợi cellulose không bị phân hủy bởi các nhân tố hóa - sinh học (Lu *et al.*, 2004).

Gen 4CL1 đã được nghiên cứu phân lập từ một số đối tượng như: Bạch dương, Bạch đàn, Thông lữ, *Arabidopsis*,... (Zenn *et al.*, 2006). Trong nội dung nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập gen 4CL1 từ cây Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.) trồng tại Việt Nam, nhằm cung cấp nguồn vật liệu cho các nghiên cứu tạo giống cây trồng biến đổi gen theo hướng cải thiện chất lượng gỗ cây rừng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.) được trồng ở rừng thực nghiệm (núi Luốt) của trường Đại học Lâm nghiệp. Cây lấy mẫu có độ tuổi từ 5 - 10 tuổi, sinh trưởng tốt, không bị sâu bệnh.

Hóa chất

Bộ hóa chất chuẩn để tách RNA tổng số từ thực vật "PureLink™ Plant RNA Reagent" (Invitrogen - Mỹ); Kit tách chiết mRNA "mRNA magnetic bead kit micro" (Invitrogen - Mỹ); Kit tổng hợp cDNA "superscript III 1st strand" (Invitrogen - Mỹ); Kit tách dòng gen "TA cloning kit" (Invitrogen -

Mỹ); Kit xác định trình tự nucleotide "BigDye^R Terminator v3.1 Cycle Sequencing"; Chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10, môi trường nuôi cấy vi khuẩn LB, các loại enzyme hạn chế và một số hóa chất thông thường khác do các hãng: Invitrogen (Mỹ), Reseachorganics (Mỹ), Fermentas (Đức) và Wako (Nhật) cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Tách mRNA tổng số và tổng hợp cDNA

Phương pháp tách mRNA tổng số và tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của các bộ Kit: PureLinkTM Plant RNA Reagent (Invitrogen - Mỹ), mRNA magnetic bead kit micro (Invitrogen - Mỹ) và Superscript III 1st strand (Invitrogen - Mỹ).

Nhân gen 4CLI từ cDNA

Cặp mồi (primers) nhân gen 4CLI từ cây Thông đuôi ngựa được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen 4CLI ở cây Thông lừ (*Pinus taeda*) đã được công bố trên Ngân hàng gen (mã số PTU12012). Cặp mồi có trình tự nucleotide như sau: Mồi xuôi: 4CL1PinF: 5'- gcggatccgcatggccaac ggaatcaa -3', có thiết kế trình tự cắt của enzyme hạn chế *Bam*HI (GGATCC) ở đầu 5'. Mồi ngược: 4CL1PinR: 5'- gcgagctctttcattttgctgccagtct -3', có thiết kế trình tự cắt của enzyme hạn chế *Sac*I (GAGCTC) ở đầu 5'.

Để nhân gen 4CLI bằng kỹ thuật PCR, cDNA sợi đơn được dùng làm khuôn. Phản ứng nhân gen được thực hiện trong tổng thể tích 50 µl với các thành phần: DEPC treated water: 38 µl; 10X PCR buffer minus Mg²⁺: 5 µl; 50 mM MgCl₂: 1,5 µl; 10 mM dNTP mix: 1 µl; 10 pM mồi xuôi 4CL1PinF: 1 µl; 10 pM mồi ngược 4CL1PinR: 1 µl; dịch cDNA: 1 µl; *Taq* DNA polymerase (5 U/µl): 0,5 µl. Phản ứng được thực hiện theo chương trình: 94°C trong 3 phút; (94°C trong 45 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút, lặp lại 40 chu kỳ); ủ ở 72°C trong 8 phút; sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C.

Sàng lọc và xác định trình tự nucleotide của gen 4CLI

Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 TA nhờ enzyme nối T4 DNA ligase, sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng TOP10. Tế bào vi khuẩn sau khi biến nạp, được cấy trải và nuôi trên môi trường LB đặc có bổ sung X-gal và kháng sinh ampicillin (100 µg/ml) để tách thành từng dòng riêng biệt. Các dòng vi khuẩn được nhân lên lượng lớn trong môi trường LB lỏng để tách chiết

plasmid cho các nghiên cứu tiếp theo. Các dòng plasmid được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme hạn chế *Bam*HI/*Sac*I và điện di trên gel agarose 1%. Trình tự nucleotide của gen 4CLI được xác định bằng phương pháp xác định trình tự tự động trên máy ABI PRISM^R 3100 - Avant Genetic Analyzer (ABI, Mỹ) tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học.

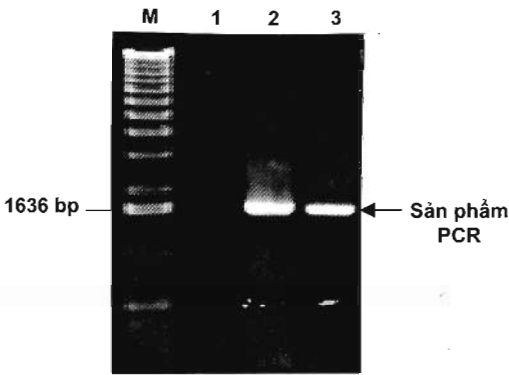
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết RNA

Để thu nhận được các phân tử mRNA đảm bảo tiêu chuẩn kỹ thuật làm khuôn cho tổng hợp cDNA, trước hết cần tách chiết RNA tổng số từ mẫu nghiên cứu. Kết quả tách RNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả thu được (không đưa ảnh) cho thấy: sử dụng bộ hóa chất chuẩn "PureLinkTM Plant RNA Reagent" của hãng Invitrogen để tách chiết RNA tổng số từ cây Thông đuôi ngựa đạt hiệu quả rất cao. RNA tổng số thu được đảm bảo chất lượng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Vì mRNA tổng số chỉ chiếm một hàm lượng rất nhỏ (khoảng từ 1 - 3%) trong RNA tổng số, tỷ lệ này phụ thuộc vào loại mô, tuổi mô, thời gian lấy mẫu để tách RNA. Mặt khác, trong dung dịch RNA tổng số còn chứa nhiều các hợp chất thứ sinh có thể gây ảnh hưởng đến kết quả tổng hợp cDNA. Do đó, nếu sử dụng trực tiếp RNA tổng số để tổng hợp cDNA thường gặp nhiều khó khăn. Để nâng cao hiệu quả tổng hợp cDNA, cần tiến hành tinh sạch mRNA. mRNA được tinh sạch từ dịch RNA tổng số bằng Kit "mRNA magnetic bead kit micro" của hãng Invitrogen. Tinh sạch mRNA đảm bảo các tiêu chuẩn kỹ thuật được dùng làm khuôn để tổng hợp cDNA.

Tổng hợp cDNA và nhân gen 4CLI

Sử dụng cDNA sợi đơn được tổng hợp từ mRNA bằng Kit "Superscript III 1st strand" dùng làm khuôn để nhân gen 4CLI bằng kỹ thuật PCR nhờ cặp mồi 4CL1PinF và 4CL1PinR. Kết quả nhân gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Trên điện di đồ (Hình 1) chỉ có một băng duy nhất, có kích thước khoảng 1,6 kb tương đương với kích thước của gen 4CLI theo lý thuyết. Như vậy, bước đầu có thể kết luận đã nhân được gen 4CLI, cặp mồi dùng để nhân gen 4CLI từ cDNA sợi đơn là rất đặc hiệu.



Hình 1. Kết quả nhân gen 4CL1 từ cDNA. M. Thang DNA chuẩn 1 kb; 1. Đối chứng âm; 2, 3. Sản phẩm nhân gen 4CL1 từ cDNA.

Sàng lọc gen 4CL1

Sản phẩm nhân gen 4CL1 từ cDNA được ghép nối vào vector tách dòng pCR2.1 TA để tạo vector tái tổ hợp pCR2.1-4CL1. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng TOP10. Sau khi biến nạp, vi khuẩn được cấy trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh ampicillin và X-gal. Các dòng tế bào vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường có kháng sinh chúng tôi mang plasmid chứa gen kháng kháng sinh. Chúng tôi tiến hành chọn 7 khuẩn lạc trắng (kí hiệu từ P1 - P7), 1 khuẩn lạc xanh (kí hiệu: Px) cấy vào 3 ml môi trường LB bổ sung ampicillin (100 µg/ml), nuôi ở 37°C qua đêm. DNA plasmid được tách ra khỏi các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Kết quả thu được (không đưa ảnh) các dòng plasmid P1, P4, P6 và P7 có kích thước lớn hơn các

dòng còn lại. Điều đó có nghĩa là các dòng plasmid này đã được chèn thêm đoạn DNA ngoại lai (có thể là gen quan tâm). Các dòng P2, P3 và P5 có kích thước tương đương với kích thước của vector pCR2.1 nên loại bỏ.

Để có cơ sở kết luận các dòng P1, P4, P6 và P7 mang gen quan tâm, các dòng plasmid này được cắt bằng cặp enzyme hạn chế *Bam*HI/*Sac*I. Kết quả điện di sản phẩm cắt (không đưa ảnh) cho thấy các dòng plasmid P1, P4, P6 và P7 đều có băng tương đương với kích thước của sản phẩm nhân gen 4CL1 và tương đương với kích thước của gen 4CL1 (1,6 kb). Như vậy, bước đầu có thể kết luận các dòng plasmid tái tổ hợp P1, P4, P6 và P7 mang gen quan tâm 4CL1.

Xác định trình tự nucleotide của gen 4CL1

Để khẳng định chắc chắn các dòng plasmid phân lập được mang gen mục tiêu 4CL1, chúng tôi tiến hành xác định trình tự nucleotide của đoạn DNA trong vector tách dòng (pCR2.1-4CL1). Trình tự nucleotide của đoạn chèn được phân tích và so sánh với trình tự nucleotide của gen 4CL1 ở cây Thông lừa (*Pinus taeda*) đã được công bố trên ngân hàng gen (mã số PTU12012). Kết quả được thể hiện trên hình 2.

Phân tích trình tự nucleotide của gen 4CL1 ở cây Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.) cho thấy toàn bộ vùng khung đọc (ORF) mang mã di truyền gồm 1614 nucleotide. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen 4CL1 ở cây Thông đuôi ngựa và cây Thông lừa có tỷ lệ tương đồng 98%, trình tự amino acid tương đồng 99%. Do gen 4CL1 lần đầu tiên được phân lập từ cây Thông đuôi ngựa, nên chúng tôi tiến hành đăng ký trình tự nucleotide của gen này trên Ngân hàng gen (mã số FJ810495).

4CL1_P.TAEDA	ATGGCCAACGGAATCAAGAAGGTCGAGCATCTGTACAGATCGAAGCTTCCCGATATCGAG
4CL1_P.MASSONIANA	ATGGCCAACGGAATCAAGAAGGTCGAGCATCTGTACAGATCGAAGCTTCCCGACATCGAG
4CL1_P.TAEDA	ATCTCCGACCATCTGCCTCTTCATTTCGTATTGCTTTGAGAGAGTAGCGGAATTCGCAGAC
4CL1_P.MASSONIANA	ATCTCCGACCATCTGCCTCTTCATTTCGTATTGCTTTGAGAGAGTAGCGGAATTCGCAGAC
4CL1_P.TAEDA	AGACCCGTGTCTGATCGATGGGGCGACAGACAGAACTATTGCTTTTCAGAGGTGGAAC TA
4CL1_P.MASSONIANA	AGACCCGTGTCTGATCGATGGGGCGACAGACAGAACTATAGCTTTTCAGAGGTGGAAC TG
4CL1_P.TAEDA	ATTTCTCGCAAGGTCGCTGCCGGTCTGGCGAAGCTCGGGTTGCAGCAGGGGCAGGTTGT C
4CL1_P.MASSONIANA	ATTTCTCGCAAGGTCGCTGCCGGTCTGGCGAAGCTCGGGTTGCAGCAGGGGCAGGTTGT C
4CL1_P.TAEDA	ATGCTTCTCCTTCCGAATTGCATCGAATTGCGTTTGTGTTTCATGGGGCCTCTGTCCGG
4CL1_P.MASSONIANA	ATGCTTCTCCTTCCGAATTGCATCGAATTGCGTTTGTGTTTCATGGGGCCTCTGTCCGG
4CL1_P.TAEDA	GGGCCATTGTGACCACGGCCAATCCTTTCTACAAGCCGGCGAGATCGCCAACAGGCC
4CL1_P.MASSONIANA	GGGCCATTGTGACCACGGCCAATCCTTTCTACAAGCCGGCGAGATCGCCAACAGGCC

4CL1_P.TAEDA	AAGGCCGAGCGCGCGCATCATAGTTACCTGGCAGCTTATGTTGAGAACTGGCCGAT
4CL1_P.MASSONIANA	AAGGCCGCGGGCGCGCATCATAGTTACCTGGCGCTTATGTTGAGAACTGGCCGAT
4CL1_P.TAEDA	CTGCAGAGCCACGATGTGCTCGTCATCACAATCGATGATGCTCCCAAGGAAGGTTGCCAA
4CL1_P.MASSONIANA	CTGCAGAGCCACGATGTGCTCGTCATCACAATCGATGATGCTCCCAAGGAAGGTTGCCAA
4CL1_P.TAEDA	CATATTTCCGTTCTGACCGAAGCCGACGAAACCAATGCCCGGCCGTGAAAATCCACCCG
4CL1_P.MASSONIANA	CATATTTCCGTTCTGACCGAAGCCGACGAAACCAATGCCCGGCCGTGAAAATCCACCCG
4CL1_P.TAEDA	GACGATGTGCTGGCGTTGCCCTATTCTTCCGGAACCACGGGGCTCCCAAGGGCGTGATG
4CL1_P.MASSONIANA	GACGATGTGCTGGCGTTGCCCTATTCTTCCGGAACCACGGGGCTCCCAAGGGCGTGATG
4CL1_P.TAEDA	TTAACGCACAAAGGCCTGGTGTCCAGCGTTGCCAGCAGGTGATGGTAAAAATCCCAAT
4CL1_P.MASSONIANA	TTAACGCACAAGGCCTGGTGTCCAGCGTTGCCAGCAGGTGATGGTAAAAATCCCAAT
4CL1_P.TAEDA	CTGTATTTCCATTCCGATGACGTGATACTCTGTGCTTGCCCTTTTTCCACATCTATTCT
4CL1_P.MASSONIANA	CTGTATTTCCATTCCGAGGACGTGATACTCTGCGTCTTGCCCTTTTTCCACATCTATTCT
4CL1_P.TAEDA	CTCAATTCGGTTCTCCTCTGCGCGCTCAGAGCCGGGGCTGCGACCCCTGATTATGCAGAAA
4CL1_P.MASSONIANA	CTCAATTCGGTTCTCCTCTGCGCGCTCAGAGCCGGGGCTGCGACCCCTGATTATGCAGAAA
4CL1_P.TAEDA	TTCAACCTCAGACCTGTCTGGAGCTGATTAGAAAATACAAGGTTACCGTTGCCCAATT
4CL1_P.MASSONIANA	TTCAACCTCAGACCTGTCTGGAGCTGATTAGAAAATACAAGGTTACCGTTGCCCAATT
4CL1_P.TAEDA	GTGCTCCAATTGCTCTGGACATCACAAAGAGCCCATCGTTTCCAGTACGATGTCTCG
4CL1_P.MASSONIANA	GTGCTCCAATTGCTCTGGACATCACAAAGAGCCCATCGTTTCCAGTACGATGTCTCG
4CL1_P.TAEDA	TCCGTCCGATAATCATGTCCGGCGCTGCGCCTCTCGGGAAGGAACTCGAAGATGCCCTC
4CL1_P.MASSONIANA	TCCGTCCGATAATCATGTCCGGCGCTGCGCCTCTCGGGAAGGAACTCGAAGATGCCCTC
4CL1_P.TAEDA	AGAGAGCGTTTTTCCAAGGCCATTTTCGGGAGGGCTACGGCATGACAGAAGCAGGCCCG
4CL1_P.MASSONIANA	AGAGAGCGTTTTTCCAAGGCCATTTTCGGGAGGGCTACGGCATGACAGAAGCAGGCCCG
4CL1_P.TAEDA	GTGCTGGCAATGAACCTAGCCTTCGCAAGAATCCTTTCCCGTCAAAATCTGGCTCCTGC
4CL1_P.MASSONIANA	GTGCTGGCAATGAACCTAGCCTTCGCAAGAATCCTTTCCCGTCAAAATCTGGCTCCTGC
4CL1_P.TAEDA	GGAACAGTCGTCGGAACGCTCAAATAAAGATCCTCGATACAGAACTGGCGAATCTCTC
4CL1_P.MASSONIANA	GGAACAGTCGTCGGAACGCTCAAATAAAGATCCTCGATACAGAACTGGCGAATCTCTC
4CL1_P.TAEDA	CCGCACAATCAAGCCGGCGAAATCTGCATCCGCGGACCCGAAATAATGAAAGGATATATT
4CL1_P.MASSONIANA	CCGCACAATCAAGCCGGCGAAATCTGCATCCGCGGACCCGAAATAATGAAAGGATATATT
4CL1_P.TAEDA	AACGACCCGGAATCCACGGCCGCTACAATCGATGAAGAAGGCTGGCTCCACACAGGCGAC
4CL1_P.MASSONIANA	AACGACCCGGAATCCACGGCCGCAACAATCGATGAAGAAGGCTGGCTCCACACAGGCGAC
4CL1_P.TAEDA	GTGCAATACATTGACGATGACGAAGAAATCTTCATAGTCGACAGAGTAAAGGAGATTATC
4CL1_P.MASSONIANA	GTGCGGTACATTGACGATGACGAAGAAATCTTCATAGTCGACAGAGTAAAGGAGATTATC
4CL1_P.TAEDA	AAATATAAGGGCTTCCAGGTGGCTCCTGCTGAGCTGGAAGCTTTACTTGTGGCTCATCCG
4CL1_P.MASSONIANA	AAATATAAGGGCTTCCAGGTGGCTCCTGCTGAGCTGGAAGCTTTACTTGTGGCTCATCCG
4CL1_P.TAEDA	TCAATCGCTGACGACGAGTCGTTCTCTCAAAGCACGAGGAGCGGGCGAGGTTCCGGTG
4CL1_P.MASSONIANA	TCAATCGCTGACGACGAGTCGTTCTCTCAAAGCACGAGGAGCGGGCGAGGTTCCGGTG
4CL1_P.TAEDA	GCCTTCGTGGTGAAGTCGTCGAAATCAGCGAGCAGGAAATCAAGGAGTTCGTGGCAAAG
4CL1_P.MASSONIANA	GCCTTCGTGGTGAAGTCATCGAAATCAGCGAGCAGGAAATCAAGGAGTTCGTGGCAAAG
4CL1_P.TAEDA	CAGGTGATTTTCTACAAGAAAATACACAGAGTTTACTTTGTGGATGCGATTCTTAAGTCG
4CL1_P.MASSONIANA	CAGGTGATTTTCTACAAGAAAATACACAGAGTTTACTTTGTGGATGCGATTCTCGAAGTCG
4CL1_P.TAEDA	CCGTCCGGCAAGATTCTGAGAAAGGATTGAGAAGCAGACTGGCAGCAAAATGA
4CL1_P.MASSONIANA	CCGTCCGGCAAGATTCTGAGAAAGGATTGAGAAGCAGACTGGCAGCAAAATGA

Hình 2. So sánh trình tự nucleotide của gen 4CL1 phân lập được từ Thông đuôi ngựa với trình tự nucleotide của gen 4CL1 từ cây Thông lửa. 4CL1_P.massoniana: Trình tự nucleotide của gen 4CL1 tách từ Thông đuôi ngựa; 4CL1_P.taeda: Trình tự nucleotide gen 4CL1 của cây Thông lửa (Mã số PTU12012).

KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công gen 4CL1 từ mRNA của cây Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana* Lamb.). Toàn bộ vùng khung đọc (ORF) mang mã di truyền của gen 4CL1 ở cây Thông đuôi ngựa gồm 1614 nucleotide mã hóa cho phân tử enzyme 4-coumarate:coenzyme A ligase gồm 537 amino acid. Trình tự nucleotide của gen này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen (mã số FJ810495).

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp và Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Christensen JH, Baucher M, O'Connell AP, VanMontagu M, Boerjan W (2000) Control of lignin biosynthesis. In *Molecular Biology of Woody Plants*, Volume 1, ed. Jain SM, Minocha SC, For Sci 64: 227-267. Dordrecht: Kluwer.

Cukovic D, Ehltling J, VanZiffle JA, Douglas CJ (2001)

Structure and evolution of 4-coumarate: Coenzyme A ligase (4CL) gene families. *J Biol Chem* 382: 645-654.

Ehltling J, Shin JJK, Douglas CJ (2001) Identification of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* 27: 455-465.

Hamberger B, Hahlbrock K (2003) The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapateactivating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(7): 2209-2214.

Kumar A, Ellis BE (2003) 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. *Plant Mol Biol* 51(3): 327-340.

Lu H, Zeng QY, Zhao YL, Wang SS, Jiang XN (2003) Xylem-specific expression of a GRP1.8 promoter: 4CL gene construct in transgenic tobacco. *Plant Growth Regul* 41(3): 279-286.

Lu H, Zhao YL, Jiang XN (2004) Stable and specific expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase gene (4CL1) driven by the xylem-specific *Pto4CL1* promoter in the transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 26(14): 1147-1152.

Zenn ZC, Yi CC, Yi HC, Yen L (2006) cDNA Cloning and Molecular Characterization of 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase in *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 21(1): 87-100.

ISOLATION OF 4CL1 GENE FROM *PINUS MASSONIANA* LAMB. IN VIETNAM

Ha Van Huan^{1,*}, Ho Van Giang¹, Nguyen Nhu Ngoc¹, Bui Van Thang¹, Nong Van Hai², Chu Hoang Ha²

¹Vietnam Forestry University (VFU)

²Institute of Biochnology (IBT)

SUMMARY

Lignin is a complex aromatic polymer of vascular plants that provides mechanical strength to the stem and protects cellulose fibres from chemical and biological degradation. 4CL1 gene encoding 4-coumarate-CoA ligase, which play a key role in lignin biosynthesis pathway in plants. The full-length cDNA of 4CL1 gene isolated from *Pinus massoniana* Lamb. contains 1614 bp encoding 537 amino acid residues. We report on the cloning and sequencing of 4CL1 gene from secondary developing xylem tissues of *Pinus massoniana* Lamb. Comparison of nucleotide sequences of 4CL1 gene from *Pinus taeda* (Accession no., PTU12012) and *Pinus massoniana* Lamb. showed 98% similarity at nucleotide level and 99% at amino acid level. The nucleotide sequence of 4CL1 gene from *Pinus massoniana* Lamb. was deposited at NCBI database with the accession number FJ810495.

Keywords: Ligin, *Pinus massoniana* Lamb., quality of wood, 4CL gene, 4-coumarate:coenzyme A ligase

* Author for correspondence: Tel: 84-4-33724823; Fax: 84-4-33840063; E-mail: hvhuanbiotech@gmail.com