TẠO CÂY THUỐC LÁ MANG CẤU TRÚC RNAi KHÁNG SOYBEAN MOSAIC VIRUS BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN

Nguyễn Thị Mai[1,2], Lê Thị Hồng Trang[2,3], Hoàng Thị Thu Hoàn[2,4], Nguyễn Vũ Bão[2], Chu Hoàng Mậu[2*]

[1] Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên,
[2] Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên,
[3] Trường Cao Đẳng Sư phạm Thái Nguyên,
[4] Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang

TÓM TẮT

Soybean mosaic virus (SMV) gây bệnh khảm đậu tương có thể làm giảm năng suất từ 50% đến 95%. Chuyển gen dựa trên cơ chế RNAi để tạo cây đậu tương kháng virus được xem là biện pháp có hiệu quả. Trong nghiên cứu này, thuốc lá được chọn là cây mô hình cho nghiên cứu tạo cây chuyển gen mang cấu trúc RNAi kháng SMV. Cấu trúc pK7GW-SMV-CPi chứa đoạn gen CPi đã được chuyển thành công vào mô lá cây thuốc lá giống C9-1 thông qua *A. tumefaciens*. Phân tích các dòng cây thuốc lá chuyển gen đã xác định được 18/20 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 chứa đoạn gen CPi được kiểm tra bằng PCR.

Từ khóa: *chuyển gen, CPi, SMV, RNA interference, thuốc lá*

MỞ ĐẦU

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là loại cây trồng dễ mẫn cảm với nhiều tác nhân gây bệnh, trong đó có những bệnh do tác nhân là virus gây ra. Soybean mosaic virus (SMV) gây bệnh khảm ở đậu tương là một trong những bệnh xuất hiện và gây thiệt hại ở nhiều vùng trồng đậu tương ở nước ta và trên thế giới. Khi bị nhiễm SMV, năng suất đậu tương có thể giảm 50%, mức giảm có thể lên đến 95% [7]. SMV lây truyền do côn trùng làm môi giới và hiện nay mới dừng lại ở biện pháp phòng mà chưa có thuốc trị. Phương pháp chuyển gen để tạo ra cây trồng kháng virus được xem là biện pháp có hiệu quả tạo cây chuyển gen kháng virus.

SMV thuộc chi Potyvirus và có vật liệu di truyền là sợi ssRNA đơn dương [5]. Hệ gen của virus SMV gồm các gen mã hóa cho 3066 amino acid, gồm 10 chuỗi polypeptide, trong đó có protein vỏ (coat protein- CP). Kết quả đọc trình tự cho thấy gen CP của SMV có kích thước 798 nucleotide, mã hóa cho 265 amino acid. Protein CP của các loài thuộc chi Potyvirus có chức năng chính là giữ ổn định và bảo vệ RNA của virus [6], [1], [2], [3], [4].

RNAi được xem là một kỹ thuật hiện đại và hữu hiệu chống lại các bệnh do virus gây ra. Cấu trúc RNAi có chứa trình tự gen lặp lại đảo chiều của virus mục tiêu được sử dụng để chuyển vào cây, nó sẽ được biểu hiện thành RNA sợi đôi dạng kẹp tóc (hpRNA) trong cây chuyển gen và kích thích cơ chế RNAi hoạt động khi có sự xâm nhập của virus gây bệnh vào cây. RNAi là cơ chế ức chế gen sau phiên mã, làm cho các phân tử mRNA bị phân hủy, cho nên không thực hiện được chức năng dịch mã, cho ra chuỗi polypeptide của gen.

Hệ thống tái sinh *in vitro* ở cây thuốc lá tương đối đơn giản và thời gian phân hóa từ mô đến cây hoàn chỉnh khá ngắn nên trong nghiên cứu chuyển gen, thuốc lá được chọn là cây mô hình. Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi chứa đoạn gen CPi kháng SMV là cơ sở ứng dụng kỹ thuật chuyển gen để tạo dòng đậu tương kháng SMV theo cơ chế RNAi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: Giống thuốc lá *Nicotania tabacum* C9-1 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1 mang cấu trúc pK7GW-SMV-CPi do Bộ môn Sinh học hiện

* *Tel: 0913383289; Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn*

đại & Giáo dục sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên cung cấp.

Phương pháp

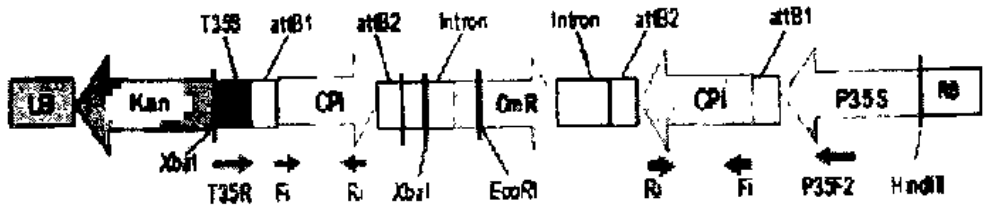
- Quy trình chuyển gen vào giống thuốc lá *Nicotania tabacum* C9-1 thông qua *A. tumefaciens* CV58C1 được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) [8]. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các thí nghiệm của phần nuôi cấy mô cây thuốc lá được thực hiện trong phòng nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng theo chu kì 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng 25°C ± 2, cường độ chiếu sáng 2000 lux.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn A. tumefaciens: Chủng khuẩn từ đĩa giữ khuẩn và cấy vạch lên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh chọn lọc (Rifamycine 0,025 g/l, kanamycine 0,05 g/l với chủng *A. tumefaciens* CV58C1 mang cấu trúc pK7GW-SMV-CPi (Hình 1) nuôi trong tủ lắc 200 vòng/phút ở 28 °C trong 48 giờ.

Tạo nguyên liệu chuyển gen: Sử dụng lá cây thuốc lá và đoạn thân để tái sinh cây *in vitro*. Môi trường nuôi cấy *in vitro* thuốc lá được trình bày ở bảng 1. Sau 2 - 3 tuần cây con được khoảng 3 - 4 lá thật thì chọn lá bánh tẻ ở các cây con khỏe mạnh. Dùng dao cắt bốn cạnh mép lá để gây tổn thương tạo thành mảnh lá có hình vuông 1 cm^2 (cắt bỏ đường gân giữa của lá). Lá bị tổn thương được đặt cảm ứng trên môi trường 150 ml (MS + 1BAP) trong 2 ngày.

Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy: Sau 48 giờ, 60 mẫu lá đã chuẩn bị ở trên được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có nồng độ OD_{600nm} đạt 0,6 – 0,8 có lắc nhẹ trong thời gian 0,5 giờ. Sau thời gian nhiễm khuẩn, mẫu được đặt ngửa lên môi trường MS2 (đồng nuôi cấy) đặc. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25°C trong thời gian là 48 giờ.

Tái sinh và chọn lọc cây chuyển gen: Sau thời gian đồng nuôi cấy, ngâm và lắc nhẹ các mảnh lá biến nạp trong dung dịch 1/2MS có bổ sung cefortaxime (0,4 g/l). Thấm khô 2 mặt các mảnh lá, chuyển sang môi trường tạo đa chồi MS2 (BAP – 0,001 g/l) có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycine 0,05 g/l, cefortaxime 0,4 g/l để tái sinh.



Hình 1. *Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pK7GW-SMV-CPi. P35S: Promoter CaMV35S, attB1 và attB2: các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng LR; LB: Left T-DNA border; RB: Right T-DNA border; T35S: terminator 35S; Kan: gen kháng kanamycin; CmR: gen kháng chloramphenicol; CPi: vị trí đoạn SMV-CPi chèn vào; XbaI, EcoRI, HindIII: vị trí cắt của các enzyme giới hạn; T35R, P35SF2, Fi, Ri: vị trí bám cặp mồi đặc hiệu SMV-CPi-Fi/SMV-CPi-Ri*

Bảng 1. *Thành phần các loại môi trường tái sinh in vitro*

Môi trường	Thành phần
Tạo đa chồi (MS2)	MS_1(20 ml/l) + MS_2(20 ml/l) + MS_3(5 ml/l) + MS_4(5 ml/l) + MS_5(5 ml/l) + aga(10 g/l) + sucrose (30 g/l) + BAP(0,001 g/l) + kanamycine (0,05 g/l) + cefortaxime (0,4 g/l)
Kéo dài chồi (MS3)	MS_1(20 ml/l) + MS_2(20 ml/l) + MS_3(5 ml/l) + MS_4(5 ml/l) + MS_5(5 ml/l) + aga(10 g/l) + sucrose (30 g/l) + BAP(0,001 g/l) + kanamycine (0,05 g/l) + cefotaxime (0,4 g/l)
Ra rễ (RM)	MS_1(20ml/l) + MS_2(20ml/l) + MS_3(5ml/l) + MS_4(5ml/l) + MS_5(5ml/l) + aga(10 g/l) + sucrose (30g/l) + IBA (0,0001g/l) + kanamycine (0,05g/l) + cefotaxime (0,4 mg/l)

Bảng 2. *Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR nhân bản đoạn gen CPi*

Ký hiệu mồi	Trình tự nucleotide	Sản phẩm dự kiến
SMV-CPi-Fi	5'- CACCGCAGCAGAAGCTTACA - 3'	294 bp
SMV-CPi-Ri	5' - GCCCAAAAGAGTGTGCATGT - 3'	

- Phân tích sự có mặt của cấu trúc chuyển gen pK7GW-SMV-CPi bằng phương pháp PCR

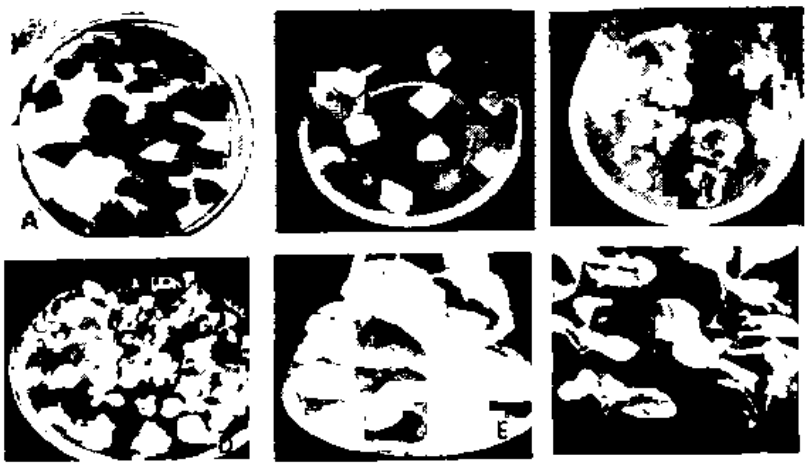
Các cây chuyển gen được trồng trong điều kiện nhà lưới, thu mẫu lá để tách DNA. Tiến hành phản ứng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi SMV-CPi-Fi/ SMV-CPi-Ri (Bảng 2) nhằm kiểm tra sự có mặt của gen chuyển CPi trong cây chuyển gen. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả chuyển cấu trúc pK7GW-SMV-CPi vào thuốc lá

Sử dụng lá cây thuốc lá và đoạn thân để tái sinh cây *in vitro*. Cắt những mảnh lá đặt trên môi trường MS1 (MS + BAP – 0,001 g/l), cắt đoạn thân của cây *in vitro* cấy lên môi trường MS để tái sinh và phát triển chồi. Sau 2 - 3 tuần và cây con được khoảng 3 - 4 lá thật thì chọn lá bánh tẻ làm nguyên liệu biến nạp.

Trong thí nghiệm này, cùng với lô thí nghiệm là hai lô đối chứng, ĐC0 (mảnh lá không chuyển gen) được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh và ĐC1 (mảnh lá không chuyển gen) được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh. Tiến hành chuyển cấu trúc pK7GW-SMV-CPi vào cây thuốc lá, thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* mang cấu trúc pK7GW-SMV-CPi vào tế bào của các mảnh lá cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* C9-1 đã được cắt tổn thương 4 cạnh và nuôi cấy trên môi trường cảm ứng MS1 (MS + BAP – 0,001 g/l) trước 2 ngày. Các mảnh lá sau hai ngày đồng nuôi cấy trong tối được rửa khuẩn bằng kháng sinh cefotaxime 0,4 g/l và được chuyển sang môi trường tạo đa chồi MS2 có bổ sung cefotaxime 0,4 g/l, kanamycine 0,05 g/l. Với mỗi lô thí nghiệm chuyển gen thực hiện 30 mảnh lá/lần biến nạp, lặp lại thí nghiệm 2 lần; còn lô đối chứng ĐC0 và ĐC1 đều tiến hành nuôi cấy 30 mảnh lá. Sau 2-3 tuần nuôi cấy các mảnh lá sống sót đã xuất hiện các cụm chồi nhỏ. Các chồi được chuyển sang môi trường kéo dài chồi, các cụm chồi nhỏ được tách từ các mảnh lá và cấy lên môi trường kéo dài chồi MS3 bổ sung cefotaxime 0,4 g/l, kanamycin 0,05 g/l để nhân nhanh chồi. Sau 1-2 tuần tiếp theo, tách các chồi nhỏ cấy chuyển sang môi trường ra rễ RM có bổ sung cefortaxime 0,4 g/l, kanamycine 0,05 g/l để tiến hành ra rễ. Sau đó tiến hành ra cây trên bầu và trồng trong điều kiện nhà lưới (hình 2).



Hình 2. *Tái sinh in vitro và tạo cây thuốc lá chuyển gen. A: các mảnh được ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn A.tumefaciens tái tổ hợp, B mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy trên môi trường tạo đa chồi; C: các cụm chồi được tạo thành sau hai tuần nuôi cấy trên môi trường tạo đa chồi; D: các chồi màu xanh được tách ra trên môi trường kéo dài chồi; E: chồi cây chuyển gen sau 3 tuần trên môi trường tạo rễ; G: Cây chuyển gen trồng trên giá thể trong nhà lưới.*

Kết quả tạo đa chồi và biến nạp cấu trúc pK7GW-SMV-CPi vào mảnh thuốc lá được trình bày ở bảng 3.

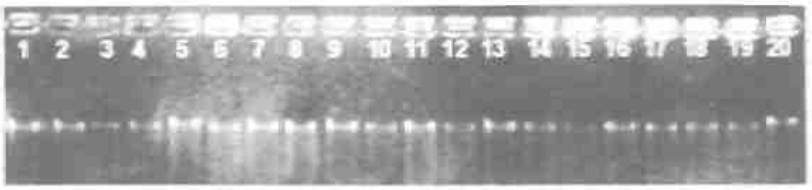
Bảng 3. *Kết quả chuyển cấu trúc pK7GW-SMV-CPi vào thuốc lá*

Cấu trúc RNAi	Số mảnh lá	Số mảnh lá sống sót cảm ứng tạo đa chồi	Số cụm chồi tạo thành	Số chồi sống sót	Số cây ra rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây trồng tại nhà lưới
pK7GW-SMV- CPi	2 x 30	42	96	127	95	30	20
ĐC0	30	0					
ĐC1	30	30	79	105	85	15	9

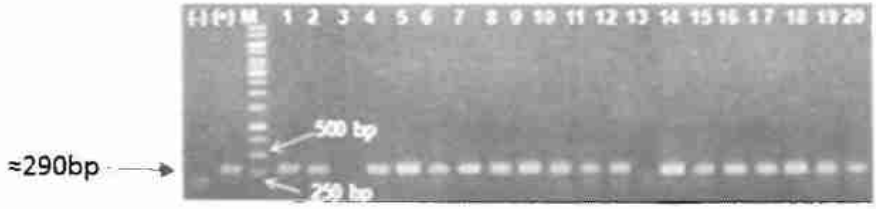
Kết quả ở bảng 2 cho thấy sau hai lần biến nạp, trong 60 mảnh lá đã thu được 42 mảnh lá sống sót trong môi trường cảm ứng tạo đa chồi, tạo được 96 cụm chồi và số chồi sống sót trên môi trường chọn lọc là 127. Số chồi ra rễ trên môi trường chọn lọc là 95 và chuyển 30 cây ra trồng trên giá thể và chọn được 20 cây sinh trưởng phát triển bình thường trong điều kiện nhà lưới. Những dòng thuốc lá chuyển gen trồng ở nhà lưới biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Trong thí nghiệm đối chứng, bảng 2 cho thấy, với 30 mảnh lá ĐC0 nuôi cấy trong môi trường có bổ sung kháng sinh kết quả là không có mẫu nào sống sót và cảm ứng tạo chồi; ở ĐC1, trong 30 mẫu tạo được 79 cụm chồi và có 105 chồi sống sót. Số cây ra rễ là 85, chọn 15 cây đưa trồng trong bầu và chuyển 9 cây trồng trong điều kiện nhà lưới.

Kiểm tra sự có mặt của cấu trúc pK7GW-SMV-CPi trong cây thuốc lá chuyển gen

Các dòng cây thuốc lá chuyển gen sau khi trồng trong nhà lưới được khoảng 4 tuần thì tiến hành thu lá để thực hiện phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn gen chuyển CPi. Các mẫu lá non của 20 dòng cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 được sử dụng được để tách DNA tổng số. Sau đó DNA tổng số sẽ được dùng làm khuôn để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc pK7GW-SMV-CPi trong cây thuốc lá chuyển gen bằng phản ứng PCR. Kết quả tách DNA tổng số được thể hiện trong ảnh điện trên gel agarose 0,8% ở hình 3.



Hình 3. *Hình ảnh điện di DNA tổng số tách từ các dòng thuốc lá chuyển gen*



Hình 4. *Hình ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn gen CPi trong các cây thuốc lá chuyển gen. 1-20: 20 dòng thuốc lá chuyển gen; (+) Đối chứng dương là plasmid pK7GW-SMV-CPi; (-) Đối chứng âm là sản phẩm PCR sử dụng khuôn DNA tách từ cây thuốc lá không chuyển gen; M: Marker 1kb (Thermo Scientific).*

Sự có mặt của gen chuyển sẽ được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu SMV-CPi-Fi/SMV-CPi-Ri, kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy đoạn gen CPi thu được có kích thước khoảng 290 bp (Hình 4). Trong nghiên cứu này, cấu trúc pK7GW-SMV-CPi đã được sử dụng và chuyển thành công vào cây thuốc lá giống C9-1 và kết quả có 18/20 cây thuốc lá dương tính với phản ứng PCR. Bằng các kỹ thuật phân tích cây chuyển gen hy vọng sẽ thu được các dòng cây thuốc lá chuyển gen kháng SMV có hiệu quả như mong đợi.

KẾT LUẬN

Giống thuốc lá giống C9-1 đã được nuôi cấy *in vitro* và tạo đủ nguyên liệu, có chất lượng tốt phục vụ thí nghiệm biến nạp cấu trúc RNAi vào mô lá thuốc lá. Cấu trúc RNAi pK7GW-SMV-CPi chứa đoạn gen CPi đã được chuyển thành công vào mô lá cây thuốc lá giống C9-1 thông qua *A. tumefaciens*. Phân tích các dòng cây thuốc lá chuyển gen đã xác định được 18/20 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 chứa đoạn gen CPi được kiểm tra bằng PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atreya C.D., Raccah B., Pirone T.P. (1990), "A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus", *Virology* 178, pp. 161-165.
2. Atreya P.L., Atreya C.D., Pirone T.P. (1991), "Amino acid substitution in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus", *Proc. Natl. Acad Sci.* USA, 88, pp. 7887-7891.
3. Atreya P.L., Lopez-Moya J. J , Chu M. Atreya, C.D., Pirone T.P. (1995), "Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids", *J Gen Virol* 76, pp. 265 - 270.
4. Fischhoff D.A., Bowdish K S., Perlak F.J., Marrone P.G., McCormick S.M., Niedermeyer J.G., Dean D.A., Kusano-Kretzmer K., Mayer E J., Rochester D.E., Rogers S.G Fraley R.T. (1987), "Insect tolerant tomatoplants", *Biotechnology* 5, pp. 807-812
5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=RNA+of+SMV
6. Jayaram CH., Hill J.H., Miller W.A. (1991). "Nucleotide sequences of the coat protein genes of two aphid-transmissible strains of soybean mosaic virus", *J Gen. Virol.* 72, pp. 1001-1003.
7. Lê Lương Tề, Vũ Triệu Mân (1999), *Bệnh vi khuẩn và bệnh virus hại cây trồng*, Nxb Giáo dục.
8. Topping JF (1998), "Tobacco transformation", *Methods of Mol Biol.*, 81, pp. 365–372.

SUMMARY

CREATE TOBACCO PLANTS CARRYING RNAi RESISTANCE TO SMV BY THE TRANSGENIC TECHNIQUE

Nguyen Thi Mai[1,2], Le Thi Hong Trang[2,3], Hoang Thi Thu Hoan[2,4], Nguyen Vu Bao [2], Chu Hoang Mau[2,*]

[1]College of Agriculture and Forestry - TNU, [2] College of Education - TNU, [3]Thai Nguyen College of Education, [4]Tan Trao University, Tuyen Quang

Soybean mosaic virus (SMV) can reduce the soybean productivity from 50% to 95%. RNAi-mediated resistance to SMV aims create antiviral soybean is considered effective measures. In this study, tobacco plants were selected as research models for creating transgenic plants carrying RNAi structure with resistance ability to SMV. PK7GW-SMV-CPi structure containing CPi gene segments has been successfully transferred into tobacco leaf tissue from cultivar C9-1 through the *A. tumefaciens*. The results of analysis of transgenic tobacco lines have identified the 18/20 transgenic tobacco lines at T0 generation containing CPi gene segments, checked by PCR.

Keywords: *CPi, gene transfer, Soybean mosaic virus, RNA interference, tobacco.*

Ngày nhận bài: 15/11/2016; Ngày phản biện: 30/11/2016; Ngày duyệt đăng: 24/01/2017

Phản biện khoa học: *TS. Vũ Thị Thu Thủy - Trường ĐH Sư phạm - ĐHTN*

* *Tel: 0913383289, Email. chuhoangmau@tnu.edu.vn*