

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ THANH NGÀ

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG CÂY DƯA HẦU
(*CITRULUS LANATUS* THUMB.)
CHUYỂN GEN KHÁNG BỆNH
VIRUS ĐỐM VÒNG PRSV**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI, 2015

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nguyễn Thị Thanh Nga

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG CÂY DƯA HẦU
(*CITRULUS LANATUS* THUMB.)
CHUYỂN GEN KHÁNG BỆNH
VIRUS ĐỐM VÒNG PRSV**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: GS.TS. LÊ TRẦN BÌNH
Viện Công nghệ Sinh học

HÀ NỘI, 2015

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới thầy giáo, GS.TS. Lê Trần Bình đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, dìu dắt, giúp đỡ tôi thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Chu Hoàng Hà, TS. Nguyễn Tường Vân, TS. Lê Văn Sơn, TS. Phạm Bích Ngọc, Ths. Phạm Thị Vân cùng tập thể cán bộ Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện làm việc, nhiệt tình giúp đỡ và truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin cũng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Bộ phận Đào tạo, các phòng chức năng và Ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và bảo vệ luận án.

Tôi xin cảm ơn Trại Sinh học thực nghiệm Cổ Nhuế, Viện Công nghệ Sinh học đã hỗ trợ tôi trong việc trồng cây thu hạt giống trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới lãnh đạo Trường Đại học Tây Bắc, Ban Chủ nhiệm Khoa Nông – Lâm cùng các đồng nghiệp đã luôn tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin dành lòng biết ơn sâu sắc tới những người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn bên tôi, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó!

Hà Nội, ngày 7 tháng 01 năm 2015

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Thanh Nga

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi, các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả.

Hà Nội, ngày 7 tháng 01 năm 2015

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Thanh Nga

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CẢM ƠN	
LỜI CAM ĐOAN	
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Giới thiệu về cây dưa hấu và bệnh hại dưa hấu.....	4
1.1.1. Cây dưa hấu.....	4
1.1.2. Các loại bệnh hại dưa hấu.....	10
1.1.3. Bệnh virus hại dưa hấu.....	11
1.2. PRSV và PRSV gây hại trên dưa hấu.....	13
1.2.1. Phân loại	13
1.2.2. Cấu trúc.....	14
1.2.3. Phạm vi kí chủ, cơ chế truyền bệnh	19
1.2.4. Biện pháp phòng trừ	20
1.2.5. PRSV gây bệnh trên dưa hấu.....	20
1.3. Ứng dụng kỹ thuật RNAi trong tạo cây trồng chuyển gen kháng virus.....	21
1.3.1. Kỹ thuật RNAi.....	21
1.3.2. Ứng dụng kỹ thuật RNAi trong tạo cây trồng kháng virus.....	26
1.3.3. Một số hạn chế của công nghệ RNAi và giải pháp.....	28
1.3.4. Một số nghiên cứu chuyển gen tạo tính kháng virus cho dưa hấu	29

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	31
2.1. Vật liệu, địa điểm nghiên cứu.....	31
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	31
2.1.2. Chúng vi sinh vật, vector.....	31
2.1.3. Dụng cụ, thiết bị, vật tư.....	32
2.1.4. Hóa chất.....	33
2.1.5. Địa điểm.....	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	33
2.2.1. Xây dựng quy trình tái sinh in vitro cây dưa hấu.....	34
2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình chuyển gen vào cây dưa hấu thông qua chuyển gen <i>gus</i>	39
2.2.3. Chuyển cấu trúc RNAi/CP-Nib-HCpro vào dưa hấu.....	44
2.2.4. Phân tích cây chuyển gen kháng PRSV.....	45
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	49
3.1. Xây dựng quy trình tái sinh cây dưa hấu	49
3.1.1. Khả năng tái sinh chồi và cụm chồi	49
3.1.2. Kết quả kích thích kéo dài chồi.....	54
3.1.3. Kết quả tạo rễ cho chồi	55
3.1.4. Ảnh hưởng của giá thể tiếp nhận đến khả năng thích ứng cây <i>in vitro</i> ...	56
3.1.5. Tổng kết quy trình tái sinh	58
3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình chuyển gen vào cây dưa hấu thông qua chuyển gen <i>gus</i>	59
3.2.1. Đánh giá khả năng sống sót của cây dưa hấu trên môi trường chứa chất	

chọn lọc Km.....	59
3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn (OD ₆₀₀) đến hiệu quả chuyển gen.....	60
3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu quả chuyển gen.....	61
3.2.4. Kết quả biến nạp gen <i>gus</i> vào dưa hấu	63
3.2.5. Kết quả phân tích các dòng cây chuyển gen <i>gus</i>	65
3.2.6. Kết quả chuyển gen <i>gus</i> vào cây dưa hấu.....	67
3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc RNAi vào dưa hấu.....	68
3.4. Kết quả phân tích biểu hiện gen và đánh giá khả năng kháng virus của các dòng cây chuyển gen	69
3.4.1. Phân tích các dòng cây chuyển gen T0.....	69
3.4.2. Phân tích các dòng cây chuyển gen T1.....	79
Chương 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	83
4.1. Khả năng nuôi cấy in vitro cây dưa hấu.....	83
4.2. Khả năng chuyển gen ở dưa hấu.....	86
4.3. Tạo tính kháng virus bằng chuyển gen ở dưa hấu.....	90
4.4. Triển vọng của các dòng chuyển gen trong bối cảnh GMO chung.....	94
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	96
1. KẾT LUẬN.....	96
2. ĐỀ NGHỊ.....	97
SUMMARY.....	98
NHỮNG CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Axit Deoxyribonucleic
ARN	Axit Ribonucleic
BAP	6 - Benzyl Amino Purin
IAA	Indol - 3 - Axetic Axit
IBA	3 - Indol Butyric Axit
NAA	α - Naptalen Axetic Axit
bp	Base pair
CP	Coat protein
Nib	Nuclear Inclusion Body <i>protein</i>
HC-Pro	Helper component-proteinase
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine Tetra-acetic Acid
LB	Luria-Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RNAi	RNA interference
miRNA	<u>microRNA</u>
siRNA	<u>small interfering RNA</u>
mRNA	<u>messenger RNA</u>
dsRNA	<u>double-stranded RNA</u>
RISC	<u>RNA-induced silencing complex</u>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

PRSV	<u>Papaya ringspot virus</u>
Km	<i>kanamycin</i>
Cefo	Cefotaxime
X-gluc	<u>5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide</u>
<i>gus</i>	<u>beta-glucuronidase</u>

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Thành phần dinh dưỡng trong dưa hấu.....	9
Bảng 1.2. Danh sách các vi sinh vật gây hại chủ yếu trên dưa hấu	10
Bảng 2.1. Thành phần các loại môi trường tái sinh có bổ sung IBA và BAP...	36
Bảng 2.2. Thành phần các loại môi trường tái sinh có bổ sung IBA, BAP, NAA.....	36
Bảng 2.3. Nồng độ GA ₃ sử dụng trên MT kéo dài chồi.....	37
Bảng 2.4. Nồng độ IBA sử dụng trên MT tạo rễ	37
Bảng 2.5. Thành phần các loại giá thể thích ứng cây in vitro	38
Bảng 2.6. Các nồng độ Km sử dụng.....	39
Bảng 2.7. Thành phần các loại môi trường	40
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của tuổi lá mầm tái sinh chồi.....	50
Bảng 3. 2. Ảnh hưởng của tổ hợp IBA, BAP, NAA đến sự phát sinh chồi.....	53
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của GA ₃ và IBA đến sự kích thích kéo dài chồi có kích thước < 1cm.....	54
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của IBA và môi trường cơ bản đến khả năng tạo rễ của chồi dưa hấu.....	56
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích ứng cây ra môi trường..	58
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ Km đến sự phát triển của chồi.....	60
Bảng 3.8. Kết quả biến nạp gen <i>gus</i> vào dưa hấu.....	64
Bảng 3.9. Kết quả chuyển cấu trúc RNAi/ <i>CP-Nib-HCpro</i> vào dưa hấu.....	67
Bảng 3.10. Kết quả biến nạp cấu trúc RNAi/ <i>CP-Nib-HCpro</i> vào dưa hấu.....	69