

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

---

**NGUYỄN THỊ PHƯƠNG NGÂN**

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG THUỐC LÁ CHUYỂN GEN  
MANG CẤU TRÚC RNAi KHÁNG ĐỒNG THỜI  
SMV VÀ BYMV**

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC**

**Chuyên ngành: DI TRUYỀN HỌC**

**Mã số: 60.42.01.21**

**Cán bộ hướng dẫn khoa học: GS.TS. Chu Hoàng Mậu**

**Thái Nguyên - 4/2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, ngày 10 tháng 4 năm 2015*

Tác giả

**Nguyễn Thị Phương Ngân**

*Ban chủ nhiệm khoa*

*Cán bộ hướng dẫn khoa học*

**GS.TS. Chu Hoàng Mậu**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành Bản luận văn thạc sĩ này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa và các thầy cô khoa Sinh - KTNN đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành đề tài luận văn.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng ADN ứng dụng, Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình tiến hành thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin cảm ơn Tiến sỹ Lò Thị Mai Thu và Thạc sĩ Lê Thị Hồng đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài luận văn.

*Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh-Kỹ thuật nông nghiệp, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.*

***Tác giả***

## MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>4</b>
1.1. SOYBEAN MOSAIC VIRUS VÀ BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS.....	4
1.1.1. Bệnh khảm ở cây đậu tương.....	4
1.1.2. Hệ gen của SMV, BYMV và Potyvirus .....	8
1.2. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RNAi TRONG TẠO CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN KHÁNG VIRUS.....	11
1.2.1. Cây thuốc lá và bệnh virus trên cây thuốc lá.....	11
1.2.2. Cơ chế RNA interference (RNAi).....	14
1.2.3. Ứng dụng kỹ thuật RNAi tạo cây trồng chuyển gen kháng virus.....	16
1.3. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PHÂN TỬ TRONG PHÂN TÍCH CÂY CHUYỂN GEN .....	18
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	<b>22</b>
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....	22
2.1.1. Vật liệu.....	22
2.1.2. Hóa chất.....	22

2.1.3. Thiết bị.....	22
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu.....	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.2.1. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2.2.2. Phân tích sự có mặt của cấu trúc chuyển gen pK7GW/SMV- BYMV-CPi bằng phương pháp PCR.....	26
2.2.3. Lây nhiễm nhân tạo SMV và BYMV vào lá cây thuốc lá .....	28
2.2.4. Phân tích số lượng bản sao virus trong cây thuốc lá chuyển gen chứa cấu trúc CPi (SMV-BYMV) bằng kỹ thuật Real time RT- PCR.....	29
<b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>30</b>
3.1. KẾT QUẢ CHUYỂN CẤU TRÚC pK7GW/SMV-BYMV-CPi VÀO THUỐC LÁ.....	30
3.1.1. Đồng nuôi cây với dung dịch <i>A. tumefaciens</i> và cảm ứng tạo cụm chồi.....	30
3.1.2. Tạo rễ và phát triển cây chuyển gen hoàn chỉnh .....	33
3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN.....	35
3.2.1. Kết quả kiểm tra cấu trúc RNAi trong các dòng thuốc lá chuyển gen .....	35
3.2.2. Phân tích khả năng kháng virus của các dòng cây chuyển gen CPi (SMV-BYMV) trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo .....	36
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>40</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>41</b>

**DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT**

AS	Acetosyringone
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-Benzyl Amino Purine
BGMV	Bean Golden Mosaic Virus
BYMV	Bean yellow mosaic virus
bp	Base pair (cặp base)
CP	Coat protein (protein vỏ)
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
cs	Cộng sự
ĐC	Đối chứng
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetate Acid
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
GA3	Gibberellic acid
GM	Môi trường tạo chồi
hpRNA	Hairpin RNA (cấu trúc RNA kẹp tóc)
lhpRNA	Intron hairpin RNA (Cấu trúc kẹp tóc mang intron)
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indole-3butyric acid
Kb	Kilo base

LB	Luria and Bertani
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
PCR	Polymerase chain reaction
RM	Môi trường ra rễ
RNAi	RNA interference
siRNA	Short interfering RNA
SMV	Soybean mosaic virus
T <sub>0</sub> , T <sub>6</sub> , T <sub>12</sub>	Các dòng thuốc lá chuyển gen
TAE	Tris Acetate EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Vir	Virulence Region
WT1, WT2, WT3	Cây thuốc lá không chuyển gen

## DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i><b>Trang</b></i>
Bảng 2.1. Thành phần các loại môi trường tái sinh <i>in vitro</i> .....	24
Bảng 2.2. Thành phần dung dịch đệm tách DNA tổng số.....	26
Bảng 2.3. Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR khuếch đại đoạn Cpi	28
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu nhân gen Cpi .....	28
Bảng 3.1. Kết quả cảm ứng chồi từ mảnh lá.....	31
Bảng 3.2. Kết quả tạo chồi từ mảnh lá.....	33
Bảng 3.3. Kết quả tạo rễ và tái sinh cây thuốc lá ở thí nghiệm và đối chứng.....	34
Bảng 3.4. Kết quả định lượng sự có mặt của virus SMV trong cây thuốc lá chuyển gen.....	39

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Lá cây đậu tương bị nhiễm SMV .....	5
<b>Hình 1.2.</b> Sơ đồ cấu trúc hệ protein của potyvirus .....	9
<b>Hình 1.3.</b> Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pK7GW-CPi (SMV-BYMV) .....	11
<b>Hình 1.4.</b> Cây thuốc lá giống C9-1 .....	11
<b>Hình 1.5.</b> Cơ chế hoạt động RNAi .....	15
<b>Hình 3.1.</b> Các mảnh lá được ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i> tái tổ hợp .....	31
<b>Hình 3.2.</b> Hình ảnh phát sinh cụm chồi.....	32
<b>Hình 3.3.</b> Hình ảnh tạo rễ trên môi trường kháng sinh chọn lọc .....	34
<b>Hình 3.4.</b> Các dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 trồng trên chậu trong nhà lưới .....	35
<b>Hình 3.5.</b> Kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số tách từ các mẫu lá cây thuốc lá chuyển gen .....	35
<b>Hình 3.6.</b> Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn CPi (SMV-BYMV) từ 21 dòng cây thuốc lá chuyển gen .....	36
<b>Hình 3.7.</b> Hình ảnh một số dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng .....	37
<b>Hình 3.8.</b> Đồ thị khuếch đại đoạn cDNA từ các mẫu thuốc lá trong phân tích Real time RT-PCR.....	38

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là một loại cây trồng cạn có giá trị kinh tế và hàm lượng dinh dưỡng cao. Hạt đậu tương được dùng làm thực phẩm cho con người, thức ăn cho gia súc. Ngoài ra những sản phẩm như khô dầu đậu tương còn được dùng làm mực in, sơn, xà phòng, chất dẻo, thuốc trừ sâu... Hạt đậu tương còn được dùng nhiều trong y học, giúp tránh hiện tượng suy dinh dưỡng ở trẻ em, người già; hạn chế bệnh loãng xương ở phụ nữ; bệnh đái tháo đường, thấp khớp... Ngoài ra đậu tương là cây trồng ngắn ngày, rất thích hợp cho luân canh, xen canh gối vụ với nhiều loại cây khác và là cây cải tạo đất rất tốt [4]. Việt Nam là một nước nông nghiệp, trong đó đậu tương cũng là một trong những cây trồng chủ đạo. Mặc dù đã bắt đầu tiến hành sản xuất trên quy mô công nghiệp từ năm 2011 nhưng Việt Nam vẫn tiếp tục phải nhập khẩu phần lớn lượng bột đậu tương nhằm bù đắp sự thiếu hụt về thực phẩm protein trong nước và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Năng suất và sản lượng đậu tương của nước ta còn ở mức khá thấp có thể do các nguyên nhân như: Nhiều giống hiện trồng mặc dù năng suất khá nhưng do tính ổn định chưa cao, sức biến động khá lớn giữa các miền, các vùng; Khả năng kháng virus và sâu bệnh của các giống đậu tương đang trồng rất thấp; Chưa có những dự báo về thời vụ gieo trồng thích hợp cho từng vùng.

Đậu tương là một trong số các cây trồng dễ bị nhiễm nhiều loại virus, ví dụ như bệnh khảm (Soybean mosaic virus - SMV), bệnh khảm vàng ở đậu tương (Soybean yellow mosaic virus - SYMV), bệnh xoắn lá, bệnh gỉ sắt hại đậu tương do nấm *Phakopsora pachyrhizi*, bệnh Sương mai (đốm phấn) do nấm *Peronospora manshurica*, bệnh lở cổ rễ do nấm *Rhizoctonia solani* hoặc