

CHUYỂN CẤU TRÚC microRNA VÀO CÂY ĐẬU NÀNH (*Glycine max* (L.) Merr.) HẠN CHẾ SỰ KÝ SINH CỦA TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita*

Nguyễn Vũ Phong, Hà Thị Trúc Mai, Đặng Lê Trâm, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Thị Ngọc Loan

Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Effector là các protein được tuyến trùng tiết vào trong tế bào thực vật, tạo thuận lợi cho quá trình ký sinh cây chủ. Bất hoạt các gene mã hóa effector này có thể làm giảm khả năng ký sinh của tuyến trùng và giúp hạn chế tác hại do tuyến trùng gây ra. Trong nghiên cứu này, gene *Minc14137* mã hóa cho một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Từ trình tự gene giải mã, cấu trúc microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene *Minc14137* được tổng hợp và gắn vào vector biểu hiện. Tiếp theo, cấu trúc này được chuyển vào lá mầm đậu nành bằng vi khuẩn *A. tumefaciens* và tái sinh tạo cây chuyển gene. Số bản sao và mức độ biểu hiện của miRNA trong cây đậu nành chuyển gene được xác định bằng kỹ thuật qPCR. Ở cây đậu nành chuyển gene thế hệ T1, khả năng ký sinh của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* giảm từ 44 - 50% so với cây đối chứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy effector MINC14137 giữ vai trò quan trọng trong tính ký sinh của tuyến trùng sưng rễ.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, hệ số sinh sản (Rf), *hptII*, nốt lá mầm, microRNA.

TỔNG QUAN

Đậu nành (*Glycine max* (L.) Merrill) là một trong những loại cây trồng quan trọng cung cấp protein và dầu thực vật trên thế giới (Khan *et al.*, 2004). Do có giá trị dinh dưỡng cao nên đậu nành được xếp vào dạng cây trồng “thực phẩm chức năng” và đóng vai trò thiết yếu để nâng cao tiêu chuẩn thực phẩm người thiếu hụt protein ở những nước đang phát triển (Chaudhary, 1985). Lượng dầu của cây đậu nành đứng ở vị trí thứ nhất trong tổng số dầu thực vật được tiêu thụ ở thế giới (<http://worldvegetableoil>). Là nước nông nghiệp nhưng với cây đậu nành, Việt Nam liên tục phải nhập khẩu theo chiều hướng năm sau cao hơn năm trước. Trong năm 2012, Việt Nam phải nhập khẩu hơn 1,2 triệu tấn với giá trị lên đến 755 triệu USD. Tuyến trùng sưng rễ, *Meloidogyne* sp. là một trong những loài tuyến trùng ký sinh thực vật gây thiệt hại về kinh tế lớn nhất trên cây trồng ở vùng ôn đới và nhiệt đới (Trudgill và Blok, 2001). Loài tuyến trùng này có khả năng lây nhiễm cho hơn 5.500 loài thực vật (Block *et al.*, 2008), trong đó có đậu nành (thất thu 93.000 tấn/năm ở Mỹ). Việc sử dụng các chất hóa học độc tính cao để kiểm soát tuyến trùng tỏ ra có hiệu quả nhưng thiệt hại về hệ thực vật và động vật, môi trường và sức khỏe con người là rất lớn. Do vậy, việc sử dụng các chất hóa học đang ngày càng bị hạn chế và xu hướng tiến đến ngưng sử dụng hoàn toàn. Ngày nay, phương pháp luân canh kết hợp với việc sử dụng các giống kháng bệnh được sử dụng. Tuy vậy, phương pháp này gặp nhiều khó khăn do tuyến trùng sưng rễ có phổ ký chủ rất rộng và giống đậu nành vừa có năng suất cao vừa kháng tuyến trùng vẫn đang được nghiên cứu. Vì vậy, việc tìm kiếm một phương pháp mới, thân thiện với môi trường để kiểm soát tuyến trùng là việc làm hết sức cần thiết. Các hiểu biết về sự tương tác giữa tuyến trùng sưng rễ và ký chủ ở mức độ phân tử cần thiết để phát triển các chương trình kiểm soát tuyến trùng một cách bền vững. Hiện nay, nhiều nghiên cứu tập trung vào việc xác định, mô tả đặc điểm, chức năng và ức chế sự biểu hiện các effector của tuyến trùng. Sử dụng phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa các protein độc tính này đang được quan tâm nghiên cứu và hứa hẹn là công cụ hữu hiệu tạo giống cây trồng kháng tuyến trùng sưng rễ.

Trong nghiên cứu này, gene *Minc14137* mã hóa cho một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *M. incognita*, được sử dụng làm dữ liệu để tổng hợp microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene này. Cấu trúc microRNA sau đó được chèn vào vector biểu hiện và chuyển vào cây đậu nành DT22 bằng vi khuẩn *A. tumefaciens*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (*Mi*) phân lập từ rễ cây đậu nành trồng Đắc Nông, được lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Giống đậu nành DT22 được cung cấp từ Trung tâm nghiên cứu và phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Vector pRS300 chứa *ath-miR319a* precursor được cung cấp bởi Detlef Weigel, Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Đức (Schwab và ctv, 2006). Vector pSM103 chứa các gene *hptII* (kháng hygromycin), gene *aadA* (kháng kanamycin), cassette 35SP-*erGFP7INT-NOS*, đoạn *miR319a* của *Arabidopsis* chịu điều khiển bởi promoter *GmUbiIII* giúp biểu hiện đoạn microRNA ở cây đậu nành được cung cấp bởi Andrew F. Bent, University of Wisconsin-Madison, Mỹ (Melito và ctv, 2010).

Tạo dòng gene *Minc14137* của tuyến trùng *M. incognita*

Từ thông tin bộ gene của tuyến trùng *M. incognita* (Abad *et al.*, 2008, <https://meloidogyne.inrae.fr/>), cặp primer đặc hiệu mã hóa protein gene *Minc14137* được thiết kế có trình tự Mi14137-F (5'-ATG AAA GCC CTC ATT AAA GC-3') và Mi14137-R (5'- TTA TTT TCC TCC AGC ACA TC -3'). RNA tổng số của J2s được tách chiết bởi GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), tổng hợp cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Đoạn trình tự mã hóa protein được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với *Pfu* polymerase. Chu kỳ nhiệt gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và được thêm đuôi polyA trước khi chèn vào vector pGEM-T Easy (Promega). Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt (Sambrook và Russell, 2001). Các khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng hệ thống xanh trắng và PCR khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) và gene tạo dòng được giải trình tự bởi công ty First Base (Malaysia).

Tạo vector mang cấu trúc miRNA nhân tạo

Trình tự gene *Minc14137* phân lập có độ tương đồng đến 95% với cDNA của tuyến trùng *M. incognita* trên GenBank (ID: AW441106.1), được sử dụng để thiết kế các miRNA nhân tạo nhờ phần mềm WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Trình tự amiRNA mục tiêu được chọn dựa theo các tiêu chí đề xuất bởi Schwab và ctv (2006). Công cụ Oligo của phần mềm WMD3 được sử dụng để thiết kế các primer thay thế đoạn microRNA của precursor ath-mi319a bởi đoạn miRNA 21 nu mới nhờ kỹ thuật PCR overlapping. Cấu trúc amiRNA sau đó được nhân dòng bởi vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) và giải trình tự nhằm đảm bảo tính chính xác trước khi gắn vào vector biểu hiện. Đoạn miR319a trong vector pSM103 (Melito và ctv, 2010) được thay thế bằng đoạn trình tự amiRNA tổng hợp. Vector pSM103 và đoạn amiRNA được cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Pst*I (Thermo Scientific) và nối với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific) để tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp pSM103-amiRNA được tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10, sau đó biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để chuyển cấu trúc amiRNA vào cây chủ.

Tạo cây đậu nành chuyển gene

Hạt đậu nành được khử trùng theo quy trình của Trần Thị Cúc Hòa (2008). Chuẩn bị mẫu lá mầm đậu nành theo quy trình của Phan Lê Tư và đồng tác giả (2018). Lá mầm đậu nành 7 ngày tuổi được giữ lại phần trụ hạ diệp cách nốt lá mầm khoảng 3 - 5 mm, đồng thời dùng dao tạo 3 - 4 vết thương tại mặt trong vị trí trụ hạ diệp tiếp giáp lá mầm. Chủng *A. tumefaciens* LBA4404 mang vector pSM103-amiRNA được tăng sinh trong môi trường YEP chứa 50 mg/L kanamycin ở 28°C đến khi OD₆₀₀ đạt 1,0 - 1,2. Tiến hành thu sinh khối vi khuẩn và pha loãng trong môi trường IM lỏng thành dạng huyền phù. Mẫu nốt lá mầm được ngâm với dịch huyền phù vi khuẩn trong 30 phút, thấm khô và đặt úp lên môi trường CCM (đồng nuôi cấy mẫu và vi khuẩn trong 4 hoặc 6 ngày) ở 25°C, trong điều kiện ánh sáng mờ. Để loại bỏ vi khuẩn trên mẫu đã lây nhiễm, rửa mẫu bằng môi trường tạo chồi bổ sung kháng sinh cefotaxime 100 mg/L, vancomycin 50 mg/L, timentin 50 mg/L. Thời gian rửa mẫu 2 - 3 phút. Mẫu sau rửa được cấy nghiêng một góc 45° trên môi trường thanh lọc có chứa cefotaxime 100 mg/L, timentin 50 mg/L. Sau 14 ngày trên môi trường thanh lọc, mẫu được chuyển sang môi trường tạo chồi có bổ sung hygromycin 5 mg/L. Sau 28 ngày, tiếp tục chuyển mẫu sang môi trường bổ sung hygromycin 10 mg/L. Chồi già định chuyển gene được tách chiết DNA bằng GenJET Plant DNA Purification Kit, đo OD xác định nồng độ và độ tinh sạch, thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp primer HptII-F (5'-CAG CGA GAG CCT GAC CTA TTG C-3') và HptII-R (5'-GCC ATC GGT CCA GAC GGC CCG CGC-3') khuếch đại gene *hptII* kháng hygromycin có trên cấu trúc plasmid.

Kiểm tra số bản sao và mức độ biểu hiện của gene chuyển

Kiểm tra sự hiện diện của gene *hptII* ở cây già định chuyển gene bằng kỹ thuật PCR. Số bản sao của microRNA chuyển vào cây đậu nành được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR theo hướng dẫn của SensiFAST SYBR No Rox Kit (Thermo Scientific) nhờ sự hiện diện của đoạn gene *hptII* (KT985053) với gene tham chiếu là *actin* (Libault *et al.*, 2008). Số bản sao của gene *hptII* được ước tính bằng tỷ lệ gene mục tiêu (*hptII*) /gene tham chiếu *actin* theo công thức $X0/R0 = 10^{[(Ct, X - IX)/SX] - [(Ct, R - IR)/SR]}$ (Weng *et al.*, 2004), trong đó Ct,X và Ct,R là giá trị Ct của gene *hptII* và *actin*; IX và SX là intercept và độ dốc của đường chuẩn (standard curve) của gene mục tiêu; IR và SR là intercept và độ dốc đường chuẩn của gene tham chiếu. Đường chuẩn của gen tiêu (*hptII*, mRNA trên plasmid) và actin của DNA bộ gen được thiết lập tương ứng theo phương pháp của Sambrook và Russell, 2001. Kích thước plasmid sử dụng trong nghiên cứu này là 12.917 bp, và bộ gen đậu nành là 1.150 Mb (Schmutz *et al.*, 2010). Các cây đậu nành chuyển gene được cảm ứng tạo rễ và tạo cây con hoàn chỉnh. Cây con được thuần dưỡng trong nhà lưới. Hạt của cây T0 được thu nhận và gieo để thu cây T1. Cây chuyển gene T1 được xác định bằng sự hiện diện của gene *hptII*. Mức độ biểu hiện của amiRNA được xác định bằng phản ứng realtime-PCR sử dụng 3 ng cDNA với gene tham chiếu actin. Sử dụng đối chứng là cây đậu nành DT22 không chuyển gene.

Đánh giá tính kháng của cây đậu nành chuyển gene với tuyến trùng

Khi cây đậu nành T1 được 15 ngày tuổi tiến hành lây nhiễm với 1000 J2. Sau 30 ngày lây nhiễm, ghi nhận các chỉ tiêu như khối lượng tươi bộ rễ, số nốt sừng, số trứng và J2 tuyến trùng. Từ đó đánh giá khả năng kháng của tuyến trùng của các cây chuyển gene. Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và xử lý thống kê bằng XLSTAT 2016. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phương pháp LSD (nếu có). Các số liệu được chuyển đổi đảm bảo phân phối chuẩn trước khi phân tích thống kê.

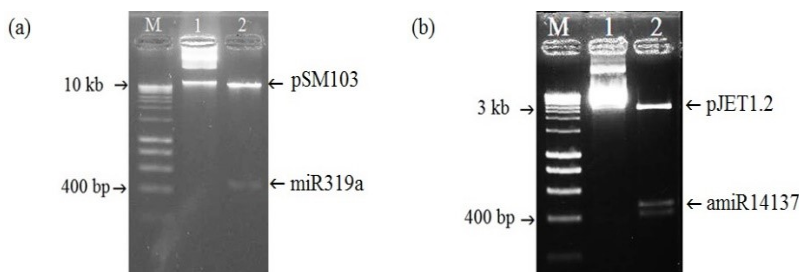
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng gene *Minc14137*

Từ cDNA tổng số của dòng tuyến trùng phân lập đã khuếch đại được sản phẩm có kích thước khoảng 400 bp tương ứng với kích thước gene mục tiêu (435 bp). Trình tự đoạn gene khuếch đại được hiệu chỉnh và so sánh với trình tự gene *Minc14137* trong dữ liệu bộ gene của *Meloidogyne incognita* (Abad và ctv, 2008; https://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita) và NCBI (ID: JK297517.1) cho kết quả tương đồng 97%. Trình tự đoạn gene *Minc14137* được đăng ký GenBank (MH315946.1) và sử dụng làm khuôn để thiết kế các miRNA nhân tạo.

Tổng hợp vector mang miRNA nhân tạo

Trong nghiên cứu này, microRNA nhân tạo được chọn ký hiệu là amiR14137, có trình tự (5'-UAA CUA UAA UCUA GGG CAC GU-'3). Cấu trúc precursor mang amiR14137 được tổng hợp và tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10. Plasmid tái tổ hợp của 3 dòng vi khuẩn ngẫu nhiên được tách chiết và giải trình tự. Kết quả sau hiệu chỉnh cho thấy cấu trúc amiR14137 trình tự đúng với dự tính.

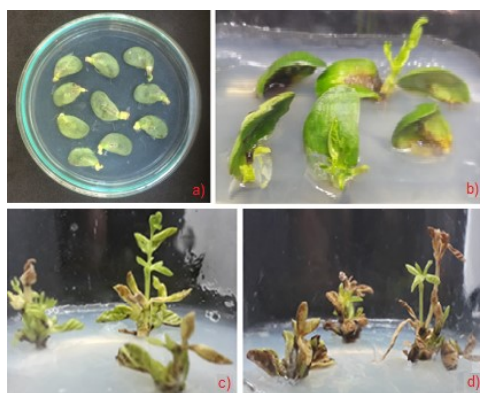


Hình 1. Kết quả cắt vector pSM103 (a) và pJET1.2-amiR14137 (b)
(M): DNA marker 1 kb (Bioline); (1): Plasmid; (2): Cắt bằng *Bam*HI và *Pst*I.

Vector pSM103 sau khi cắt tạo hai đoạn có kích thước lần lượt là 412 bp và 12 kb; plasmid pJET1.2/blunt-amiR14137 cho một đoạn 428 bp và một đoạn 2974 bp. Trên thực tế, kết quả điện di sản phẩm cắt vector pSM103 cho một băng có kích thước lớn hơn 10 kb và một băng tương đương 400 bp, plasmid pJET1.2/blunt-amiR14137 cho một băng gần 3 kb và một băng hơn 400 bp (Hình 1). Vector pSM103 mở vòng và đoạn amiR14137 được thu hồi từ gel agarose bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Sau đó sản phẩm được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Kết quả đã tạo dòng thành công amiRNA và cấu trúc này được thu nhận, biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 và áp dụng tạo cây đậu nành chuyển gene.

Tạo cây đậu nành chuyển gene

Mẫu trên môi trường đồng nuôi cấy CCM cảm ứng phình to, mép lá cong lên khỏi mặt tiếp xúc với môi trường, chồi tái sinh trên môi trường TSTL cao từ 1 - 2 cm, chồi có màu xanh nhạt từ 1 - 2 chồi (Hình 2).



Hình 2. Hình thái mẫu đậu nành và chồi tái sinh trên các môi trường
a) đồng nuôi cấy; b) tái sinh chồi; c) 5 mg/L hygromycin; d) 10 mg/L hygromycin

Khi lây nhiễm với *A. tumefaciens*, tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi cao hơn khi không lây nhiễm (khoảng 5,8 - 14,1%). Tỉ lệ mẫu tái sinh chồi ở thời gian đồng nuôi cấy 6 ngày cao hơn so với 4 ngày nuôi cấy. Mẫu đồng nuôi cấy 4 ngày có tỉ lệ mẫu cảm ứng từ 58% đến 70%, tỉ lệ mẫu tạo chồi sau 14 ngày lần lượt là 20% và 21%. Đối với mẫu đồng nuôi cấy 6 ngày, tỉ lệ mẫu cảm ứng đạt từ 80% đến 84%, tỉ lệ mẫu tạo chồi sau 14 ngày đạt từ 30% đến 39% (Bảng 1). Vì vậy trong nghiên cứu này, thời gian đồng nuôi cấy 6 ngày phù hợp cho giống đậu nành ĐT22.

Bảng 1. Kết quả chọn lọc chồi giả định chuyển gene đậu nành

Thời gian	Đợt	Mẫu	Số mẫu cảm ứng (%)	Số mẫu tạo chồi sau 14 ngày (%)	Số chồi/mẫu sau 14 ngày
4 ngày	1	ĐC	54,7	15,0	1,25 ± 0,35
		LN	70,0	20,8	1,27 ± 0,33
	2	ĐC	50,0	15,0	1,25 ± 0,35
		LN	58,0	21,6	1,24 ± 0,26
6 ngày	1	ĐC	74,7	25,0	1,17 ± 0,23
		LN	80,7	39,1	1,39 ± 0,25
	2	ĐC	64,7	20,0	1,34 ± 0,47
		LN	84,0	30,0	1,26 ± 0,25

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu sống trên môi trường chứa hygromycin

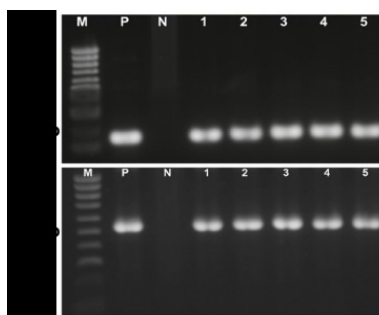
Đợt	Tỷ lệ mẫu sống (%)	
	+ 5 mg/L hygromycin 28 ngày	+ 10 mg/L hygromycin 28 ngày
1	96,0 (24/25)	8,0 (2/25)
2	89,3 (25/28)	9,3 (3/28)

Trong nghiên cứu này, chồi giả định chuyển gene được chọn lọc trên môi trường bổ sung 10 mg/L hygromycin tương đồng với nghiên cứu của (Phan Lê Tư và ctv, 2018). Các chồi giả định chuyển gene khi chuyển lên môi trường chứa 5 mg/L hygromycin vẫn phát triển với tỷ lệ mẫu sống trên 90% (bảng 2), tuy nhiên một phần lá mầm bị vàng, xuất hiện các đốm đen trên lá mầm và chồi phát sinh, trụ mầm bị hoá nâu. Sau 28 ngày, chuyển mẫu chồi lên môi trường chọn lọc chứa 10 mg/L hygromycin hầu hết chồi nhanh bị ức chế sinh trưởng, vàng lá và chết (Hình 3). Sau 14 ngày, còn 8% mẫu chồi còn sống. Mẫu chồi đậu nành còn sống được kiểm tra bằng PCR và chuyển sang môi trường vượn chồi.



Hình 3. Chồi đậu nành trên môi trường bổ sung 10 mg/L hygromycin sau 14 ngày
a) Đợt 1; b) Đợt 2

DNA tổng số từ lá 5 cây đậu nành giả định chuyển gene được tách chiết để xác định thể chuyển gene thông qua sự hiện diện của gene *hptII*. Kết quả cho thấy 5 chồi giả định chuyển gene xuất hiện băng có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với kích thước gene *hptII* là 508 bp (Hình 4). Do đó, có thể khẳng định bước đầu thu nhận được chồi chuyển gene T0.



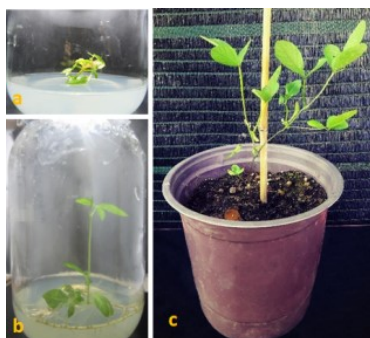
Hình 4. Kết quả PCR gene *golgin 84* (trên) và *hptII* (dưới) các chồi giả định chuyển gene
(M): Thang DNA chuẩn 100 bp (Bioline); (1, 2, 3, 4, 5) chồi đậu nành giả định chuyển gene. Hình trên: (P): Đậu nành không lây nhiễm; (N): Đối chứng âm; Hình dưới: (P): Plasmid pSM103; (N): Đậu nành không lây nhiễm.

Số copy chèn vào bộ gene cây đậu nành T0 được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR. Tỷ số gene *hptII* /gene tham chiếu của cây chuyển gene so với đối chứng dao động từ 0,79 - 1,58 cho thấy số bản *hptII* là 1 hoặc 2 (Bảng 3).

Bảng 3. Số copy gene *hptII* trong cây đậu nành T0

Mẫu đậu nành	Ct <i>actin</i>	Ct <i>hptII</i>	Tỷ số <i>hptII/actin</i>	Số copy <i>hptII</i>
ĐT22-1	23,79	24,17	1,52	2
ĐT22-2	23,56	24,08	1,38	1
ĐT22-3	23,22	24,54	0,79	1
ĐT22-4	23,69	24,01	1,58	2
ĐT22-5	23,41	24,56	0,89	1

Các chồi được tiếp tục nuôi tạo rễ hoàn chỉnh và thuần hóa nhằm thu nhận được cây T1 cho các phân tích tiếp theo (Hình 5).

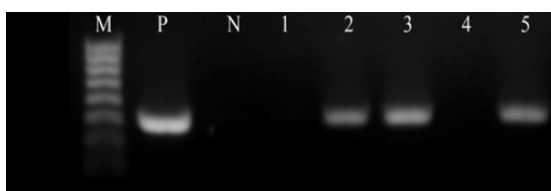


Hình 5. Tạo cây đậu nành chuyển gene

(a) Chồi đậu nành trên môi trường cấy ứng vượn chồi; (b) Chồi đậu nành tạo rễ; (c) Cây đậu nành T0 trồng trong nhà lưới.

Xác định cây chuyển gene thế hệ T1

Các cây đậu nành chuyển gene T0 mang gene chuyển ở dạng dị hợp tử. Để kiểm tra tính kháng của cây T1 đối với tuyến trùng cần xác định sự hiện diện và mức độ biểu hiện của gene chuyển. Hạt của các cây chuyển gene T0 giống ĐT22 được gieo trong nhà lưới và cây chuyển gene T1 được xác định thông qua sự hiện diện của gene chuyển *hptII*. Kết quả phân tích PCR cho thấy có 3 cây chuyển gene T1 là ĐT22-2-2, ĐT22-3-1; ĐT22-5-1 (Hình 6).

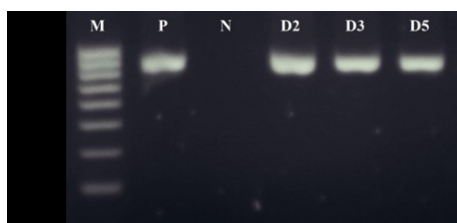


Hình 6. Kết quả điện di PCR gene *hptII* ở các cây thế hệ T1

(M): Thang DNA chuẩn 100 bp (Bioline); (P): Đối chứng dương; (N): Đối chứng âm; (1, 2, 3, 4, 5): ĐT22-2-1, ĐT22-2-2, ĐT22-3-1; ĐT22-3-2; ĐT22-5-1.

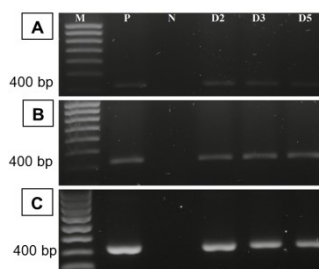
Xác định sự biểu hiện của amiRNA trong cây đậu nành T1

cDNA tổng số ba cây ĐT22-2-2, ĐT22-3-1; ĐT22-5-1 được tổng hợp để xác định mức độ biểu hiện của miRNA ở cây đậu nành. Primer của gene *actin* đậu nành (*GmAct*) được sử dụng như đối chứng kiểm tra chất lượng của cDNA (Hình 7).



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR gene *actin* đậu nành

(M): Thang DNA chuẩn 100 bp; (P): Đối chứng dương; (N): đối chứng âm; (D2, D3, D5): ĐT22-2-2, ĐT22-3-1; ĐT22-5-1.



Hình 8. Kết quả semi RT-PCR đoạn amiR-16281 ở các cây T1

Mức độ biểu hiện tương đối của amiR-16281.1 được phân tích bởi phản ứng semi RT-PCR với 25; 30; 35 chu kỳ. Kết quả cho thấy sự biểu hiện của amiRNA ở ba cây chuyển gene T1 tương đương nhau thông qua cường độ phát sáng của sản phẩm PCR khi chụp dưới tia UV (Hình 8). Mức độ biểu hiện của microRNA còn được xác định bằng kỹ thuật qPCR. Kết quả cho thấy 3 cây đậu nành chuyển gene đều có sự biểu hiện của microRNA với mức độ cao gấp từ 3 – 6 lần cây không chuyển gene, thấp nhất ở cây DT22-3-1 (Bảng 4).

Bảng 4. Mức độ biểu hiện của miRNA ở ba cây đậu nành chuyển gene

Cây đậu nành	Ct actin	Ct miRNA	Tăng so với cây không chuyển gene
ĐT22-2-2	23,09	26,89	6,84
ĐT22-3-1	23,49	32,54	3,21
ĐT22-5-1	23,28	28,08	5,97

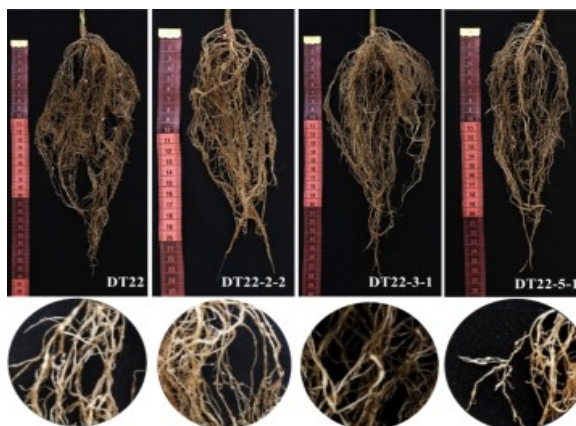
Mức độ kháng tuyến trùng của các cây đậu nành chuyển gene

Sau 30 ngày lây nhiễm với 1000 J2, số liệu về khối lượng rễ tươi và số nốt sừng hình thành, số con cái, số túi trứng, trứng và tuyến trùng J2 được ghi nhận. Ở cây chuyển gene, các chỉ tiêu ghi nhận giảm từ 45 – 50% so với đối chứng (Bảng 5).

Bảng 5. Mức độ kháng tuyến trùng Mi của các cây đậu nành chuyển gene

Cây	Số nốt sừng/1 g rễ	Số con cái/1 g rễ	Số túi trứng/1 g rễ	Số J2/1 g rễ	Số J2/50 g đất	Rf	Giảm (%)
ĐT22	53,3	25,1	21,5	7,1	46,6	2,89	-
ĐT22-2-2	37,1	14,2	7,1	4,4	23,1	1,43	50,5
ĐT22-3-1	37,4	10,3	2,8	11,3	25,0	1,60	44,6
ĐT22-5-1	39,5	21,3	11,3	8,0	22,8	1,47	49,1

Cây đậu nành chuyển gene sinh trưởng bình thường so với cây đối chứng không chuyển gene, các nốt sừng tạo ra trên rễ ít hơn so với cây đối chứng (Hình 9).



Hình 9. Rễ đậu nành chuyển gene sau 30 ngày lây nhiễm tuyến trùng

Kết quả đã xác định được cả ba cây đậu nành chuyển gene có khả năng kháng đối với tuyến trùng *Meloidogyne incognita*, chứng minh vai trò quan trọng của effector tham gia trong quá trình ký sinh của tuyến trùng và hiệu quả của phương pháp RNA can thiệp ứng dụng trong chọn tạo giống cây trồng kháng với tác nhân sinh học gây bệnh.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Dựa vào trình tự gene *Minc14137*, cấu trúc amiRNA có khả năng bất hoạt sự biểu hiện của gene này đã được tổng hợp và biến nạp thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để tạo cây đậu nành biến đổi gene. Thời gian đồng nuôi cây 6 ngày giúp tăng số mẫu tạo chồi sau lây nhiễm và hiệu quả chuyển nạp gene so với thời gian đồng nuôi cây 4 ngày. Cần tiếp tục cải tiến quy trình chuyển gene và tạo cây đậu nành, sau đó thực hiện khảo sát thực tế với tuyến trùng *M. incognita* nhằm làm sáng tỏ vai trò của effector MINC14137.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Vũ Phong (2018). Tạo vector biểu hiện chứa cấu trúc microRNA nhân tạo nhằm bất hoạt gene tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp* 2: 48-49.
- Phan Lê Tư, Tôn Bảo Linh, Nguyễn Vũ Phong (2018). Đánh giá khả năng tái sinh và chuyển gene nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* ở một số giống đậu nành. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp* 1: 8-15.
- Trần Thị Cúc Hoà (2008). Tối ưu hóa quy trình chuyển nạp gene đậu tương bằng cải tiến phương pháp lây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 9: 8-11.
- Abad P, Gouzy J, Aury J, Castagnone-Sereno P, Danchin E, et al. (2008). Plant parasitism in metazoans: insights from the *Meloidogyne incognita* nematode genome. *Nat Biotech* 26: 909–915.
- Lippmann B, Lippmann G (1984). Induction of somatic embryos in cotyledons tissue of soybean *Glycine max* (L.) Merrill. *Plant Cell Rep* 3: 215-218.
- Libault M, Thibivilliers S, Bilgin DD, Radwan O, Benitez M, et al. (2008). Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *Plant Genom* 1: 44–54.
- Melito S, Heuberger AL, Cook D, Diers BW, MacGuidwin AE, Bent AF (2010). A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the Rhg1 locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance. *BMC Plant Biol* 10: 104.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D, 2006. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J (2010). Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.

TRANSFORMATION AN ARTIFICIAL microRNA TO SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.) REDUCING THE PARASITE OF *Meloidogyne incognita*

Nguyen Vu Phong, Ha Thi Truc Mai, Dang Le Tram, Nguyen The Phuong, Nguyen Thi Ngoc Loan

Department of Biotechnology, Nong Lam University - Ho Chi Minh City

SUMMARY

Effectors are specific proteins secreted by nematodes into plant cells that facilitate their parasitism to host plants. Inactivation of these effectors could reduce the parasitic ability of nematodes on plants and to help reduce the damage caused by nematodes. Gene *Minc14137* encodes an effector unknown function that is cloned from the *Meloidogyne incognita*. Artificial microRNAs capable of inactivating gene *Minc14137* were synthesized and inserted into expression vector in soybean. This structure was transformed into the soybean cotyledon node mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regenerating transgenic plants. Copy number and the expression level of miRNA in T0 transgenic plants were determined by qPCR technique. In T1 transgenic soybean plants, the pathogenic ability of root-knot nematode is reducing by 44-50% compared to the control plants. Results show that effector MINC14137 could play an important role in the parasitism of *Meloidogyne incognita*.

Keywords: Agrobacterium tumefaciens, htpII, cotyledonary node, microRNA, reproductive factor (Rf).

* Author for correspondence: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn