

ĐÁNH GIÁ SỰ ỔN ĐỊNH TÍNH KHÁNG VIRUS CỦA CÁC DÒNG THUỐC LÁ CHUYỂN GEN MANG CẤU TRÚC RNAi TMV VÀ RNAi TCYS Ở THỂ HỆ T1

Lê Thị Thủy², Phạm Thị Vân¹, Nguyễn Văn Đoàn¹, Lâm Đại Nhân¹, Lê Văn Sơn^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *levanson@ibt.ac.vn

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

TÓM TẮT: Nghiên cứu tạo giống cây trồng kháng virus bằng công nghệ RNAi là phương pháp hiện đại và hiệu quả trong việc phòng chống các bệnh virus hại thực vật. Trong các công bố trước, chúng tôi đã tạo được các dòng thuốc lá T0 giống K326 và C9-1 chuyển gen mang cấu trúc RNAi TMV và RNAi TCYS có khả năng kháng hoàn toàn với virus. Trong nghiên cứu này, sự di truyền của cấu trúc gen chuyển và tính kháng virus của các dòng thuốc lá chuyển gen tiếp tục được đánh giá ở thể hệ T1. Kết quả đã thu được 10 dòng cây mang cấu trúc RNAi TMV và 6 dòng cây mang cấu trúc RNAi TCYS có sự phân li gen chuyển là 3:1. Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu và lai Southern blot, kết hợp với lai Northern blot đã chứng minh sự di truyền và hoạt động của cấu trúc gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen ở cả 2 giống K326 và C9-1. Qua thí nghiệm lây nhiễm với virus, mỗi dòng thuốc lá chuyển cấu trúc RNAi TMV đều thu được cây kháng hoàn toàn với virus khảm thuốc lá, với tỷ lệ kháng dao động từ 5-20%. Trong 6 dòng chuyển cấu trúc RNAi TCYS, thu được 3 dòng có cây kháng hoàn toàn với 4 virus là TMV, CMV, TYLCV và TSWV, với tỷ lệ kháng 5%. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, tính kháng virus tạo được đã di truyền sang cây chuyển gen thể hệ T1, mở ra cơ hội cho sự phát triển giống thuốc lá chuyển gen kháng các loại virus gây hại phổ biến ở Việt Nam.

Từ khóa: Lây nhiễm virus, RNAi, thuốc lá, TMV, tính kháng virus.

MỞ ĐẦU

Với khoảng 1.000 loài hại thực vật được phát hiện và hơn 650 loài đã được nghiên cứu, virus là một trong những tác nhân gây bệnh chính làm giảm sản lượng cây trồng trong sản xuất nông nghiệp. Đặc biệt, các virus thường có phổ kí chủ rộng, lan truyền theo nhiều con đường và không thể phòng trừ bằng thuốc nên khi bùng phát thành dịch, bệnh virus thường để lại tổn thất lớn về kinh tế cho người sản xuất. Vì vậy, chọn tạo giống kháng bệnh là một biện pháp hiệu quả giúp giảm thiểu tác hại của bệnh virus trên các loại cây trồng, trong đó có cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.). Là cây kí chủ của hơn 20 loài virus khác nhau, cho nên, thuốc lá là một trong những đối tượng xuất hiện nhiều nhất trong các nghiên cứu tạo cây trồng chuyển gen kháng virus [5].

Với sự phát triển mạnh của công nghệ sinh học, trong hai thập kỉ gần đây, hiện tượng bất hoạt gen theo cơ chế RNAi (RNA interference) đã trở thành một công cụ hiện đại và được ứng dụng phổ biến trong tạo giống cây trồng kháng virus [5]. Cho đến nay, trên thế giới, đã có

nhều loại cây trồng kháng virus được tạo thành công dựa trên công nghệ RNAi, trong đó có nhóm cây kháng được một loại virus như: lúa [16], khoai tây [10], cà chua [7]... và nhóm cây kháng đồng thời với nhiều loại virus khác nhau như: đậu tương [15], dưa hấu [8]... Trong nghiên cứu trước của chúng tôi, cơ chế RNAi cũng được ứng dụng trong tạo các dòng thuốc lá T0 chuyển gen kháng virus khảm thuốc lá (Tobacco mosaic virus-TMV) và kháng virus phổ rộng (gồm 4 loại virus là TMV, CMV-Cucumber mosaic virus, TYLCV-Tomato yellow leaf curl virus và TSWV-Tomato spotted wilt virus). Kết quả đánh giá tính kháng sơ bộ cho thấy, tỷ lệ kháng TMV thu được ở 2 giống K326 và C9-1 lần lượt là 64,3% và 58,3%, tỷ lệ kháng virus phổ rộng là 30,3% [11, 12].

Để tiếp tục theo dõi và đánh giá khả năng kháng virus của các dòng thuốc lá chuyển gen ở thể hệ tiếp theo, trong nghiên cứu này, hạt T1 thu từ cây thuốc lá chuyển gen T0 được sử dụng làm vật liệu. Mức độ hoạt động của cấu trúc chuyển gen được xác định thông qua thí nghiệm đánh giá sự phân li, sự di truyền và biểu hiện

tính kháng ở mức độ phân tử của gen chuyển và thí nghiệm lây nhiễm virus.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hạt thuốc lá T1 thu từ các dòng thuốc lá chuyển gen T0 mang cấu trúc RNAi TMV và RNAi TCYS có khả năng kháng hoàn toàn với virus. Trong đó, cấu trúc RNAi TMV là vector chứa đoạn gen CP (313 bp) mã hóa cho protein vỏ của TMV được thiết kế lặp lại đảo chiều, xen giữa là 1 trình tự intron; RNAi TCYS là vector chuyển gen được thiết kế tương tự, đoạn gen TCYS (1.000 bp) được tạo thành từ sự ghép nối các đoạn gen chức năng của 4 virus gồm: 3 đoạn gen CP của 3 virus TMV, CMV, TSWV và 1 đoạn gen đa đoạn của TYLCV (đoạn gen CP, C1/C2, C1/C4 và β C1). Các vector chuyển gen chứa gen chọn lọc *manA* thay thế gen chọn lọc kháng kháng sinh, cho phép sử dụng đường mannose làm chất chọn lọc [11, 12].

Phương pháp phân tích sự phân li của gen chuyển

Sự phân li của gen chuyển trong các dòng thuốc lá T1 được đánh giá dựa trên chỉ thị chọn lọc mannose. Hạt T1 thu từ cây T0 sau khi khử trùng bằng khí clo, được gieo trên môi trường MS chứa 30 g/l sucrose. Khi cây con đạt kích thước từ 3-4 cm, tiến hành cấy chuyển sang môi trường chọn lọc MS có bổ sung 30 g/l mannose. Số mẫu thí nghiệm của mỗi dòng chuyển gen là 80 cây. Tỷ lệ phân li gen chuyển được tính bằng số cây chịu mannose/số cây không chịu mannose. Sử dụng phân tích thống kê bằng kiểm tra giá trị χ^2 , tìm ra các dòng cây chuyển gen T1 cho tỷ lệ phân li 3:1.

Phương pháp PCR và lai Southern blot

DNA tổng số từ lá cây thuốc lá chuyển gen được tách chiết theo phương pháp CTAB và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt gen chuyển với các cặp mồi đặc hiệu (TMV-CP-Fi/Ri khuếch đại gen CP của TMV [11], TMV-CP-Fi/TSWV-CP-Ri khuếch đại đoạn gen TCYS [12]). Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1%, rồi chuyển màng và lai với mẫu dò tương ứng của gen CP TMV và đoạn gen TCYS theo hướng dẫn của bộ kit Biotin DecaLabel DNA Labeling (Fermentas). Sau đó, thực hiện phản ứng hiện

màng theo Biotin Chromogenic Detection Kit (Themoscience).

Phương pháp lai Northern blot

Khoảng 40 μ g RNA tổng số, tách bằng Trizol (Invitrogen) từ mẫu lá của các dòng chuyển gen không biểu hiện bệnh sau lây nhiễm virus được sử dụng cho lai Northern blot.

Phản ứng lai Northern blot đối với phân tích mARN gồm 5 bước: (1) Điện di RNA tổng số trên agarose; (2) Chuyển màng; tương tự như Southern blot; (3) Tổng hợp mẫu dò DNA; (4) Tiền lai, lai và rửa màng và (5) Hiện màng. Các bước thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của các bộ kit Biotin DecaLabel DNA Labeling (Fermentas) và Biotin Chromogenic Detection Kit (Themoscience). Trong đó, nhiệt độ tiền lai và lai được tăng lên tới 47°C vì ái lực giữa RNA và mẫu dò cao hơn trong lai Southern blot và nhiệt độ rửa màng là 65°C.

Phương pháp đánh giá tính kháng virus

Hai loại virus TMV và CMV được lây nhiễm độc lập theo phương pháp của Herber (1996) [3]. Quá trình lây nhiễm được tiến hành sau khi cây được trồng ở nhà lưới 1 tháng và đạt chiều cao khoảng 10-30 cm. Virus được lây nhiễm 3 lần vào các giai đoạn 30, 40, 50 ngày sau trồng. Triệu chứng bệnh được quan sát sau 5-10 ngày lây nhiễm.

TYLCV được lây nhiễm bằng nguồn môi giới tự nhiên là bọ phấn, thí nghiệm được bố trí theo mô tả của Nguyễn Thị Hải Yên (2011) [13].

TSWV được lây nhiễm đồng thời theo phương pháp nhân tạo như mô tả của Bucher (2006) [2] kết hợp với lây nhiễm qua môi giới tương tự như với TYLCV.

Hai mươi cây của mỗi dòng được trồng để đánh giá tính kháng riêng rẽ với từng loại virus. Các dòng thuốc lá mang cấu trúc đa đoạn RNAi TCYS được trồng ở 2 khu vực tại Trại thực nghiệm Sinh học, Cổ Nhuế, Bắc Từ Liêm, Hà Nội của Viện Công nghệ sinh học là: nhà lưới cách li (lây nhiễm TMV và CMV); vườn thực nghiệm cách li (lây nhiễm TYLCV và TSWV).

Biểu hiện bệnh được đánh giá theo các thang phân cấp từ 0 đến 4 theo từng loại bệnh virus. Trong đó, mức độ biểu hiện bệnh do nhiễm TMV theo mô tả của Wang (2009) [14],

mức độ nhiễm CMV đánh giá theo Ntui (2013) [10], mức độ nhiễm TYLCV đánh giá theo Abhary (2006) [1] và mức độ nhiễm TSWV đánh giá theo Laskowska (2013) [6]. Tỷ lệ kháng hoàn toàn với virus được tính là tỷ lệ giữa cây biểu hiện bệnh ở mức 0/tổng số cây theo dõi ở mỗi dòng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích sự phân li gen chuyển

Trong chuyển gen thực vật, gen chọn lọc thường đi kèm với gen đích, vì vậy trong nhiều nghiên cứu, bên cạnh vai trò sàng lọc cây chuyển gen sau biến nạp, các gen này còn được sử dụng gián tiếp để đánh giá sự phân li của gen chuyển [4, 16]. Việc phân tích sự phân li của gen chuyển ở thể hệ T1 là một bước quan trọng để tìm ra các

dòng cây đồng hợp tử gen chuyển, thể hiện sự di truyền và biểu hiện tính trạng một cách ổn định. Trong nghiên cứu này, sự phân li của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen ở thể hệ T1 được xác định dựa trên chỉ thị chọn lọc mannose. Cụ thể, cây con T1 (nảy mầm từ hạt thuốc lá thu được ở các dòng T0 kháng hoàn toàn với virus sau lây nhiễm) được nuôi cấy trên môi trường chứa 30 g/l mannose. Cây mang gen chọn lọc *manA* ra rễ và sinh trưởng tốt trong môi trường nuôi cấy, trong khi cây không mang gen này không có khả năng ra rễ (hình 1). Như vậy, căn cứ vào kiểu hình biểu hiện của các cây con trên môi trường chọn lọc, tỷ lệ phân li gen chuyển được đánh giá dựa trên tỷ lệ giữa số cây sống sót và ra rễ với số cây sinh trưởng kém và không tạo rễ. Nếu tỷ lệ này là 3:1 có nghĩa dòng cây thí nghiệm chỉ mang 1 bản sao của gen chuyển theo định luật phân li đơn gen của Mendel.

Bảng 1. Kết quả phân li 3:1 của gen chọn lọc trong các dòng cây thuốc lá chuyển gen thể hệ T1 trên môi trường chứa mannose

STT	Dòng cây T0	Tổng số hạt T1 kiểm tra	Số cây chịu mannose	Số cây mầm cảm mannose	Giá trị χ^2 P=0,05
Cấu trúc RNAi TMV					
1	TMV-K02	80	66	16	2,40
2	TMV-K04	80	58	22	0,27
3	TMV-K11	74	56	18	0,02
4	TMV-K13	80	60	20	0,00
5	TMV-K18	80	59	21	0,07
6	TMV-K23	80	60	20	0,00
7	TMV-C03	80	60	20	0,00
8	TMV-C05	80	58	22	0,27
9	TMV-C10	80	56	18	0,02
10	TMV-C12	80	59	21	0,07
Cấu trúc RNAi TCYS					
1	TCYS-K06	80	58	22	0,27
2	TCYS-K07	80	56	18	0,02
3	TCYS-K18	80	65	15	1,25
4	TCYS-K20	80	66	14	2,40
5	TCYS-C12	80	59	21	0,07
6	TCYS-C17	80	60	20	0,00

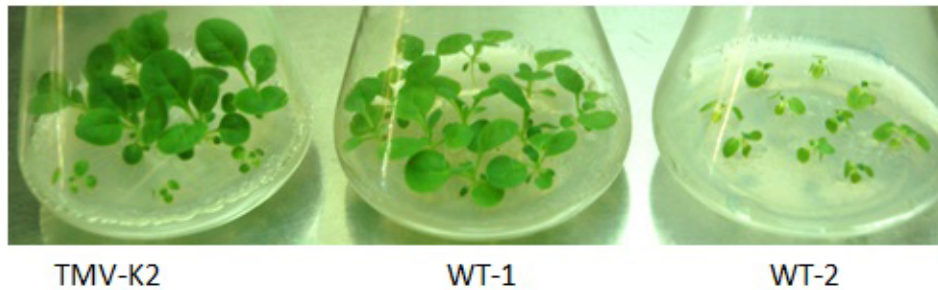
Giá trị χ^2 ($p=0.050$ bé hơn 3,84 thì giá trị quan sát phù hợp với giá trị tính toán dưới định luật Mendel (<http://www2.lv.psu.edu/jxm57/irp/chisquar.html>)).

Đánh giá tính phân li của gen chuyển đối với 17 dòng K326 (1 dòng không thu được hạt) và 7 dòng C9-1 kháng hoàn toàn với TMV thuộc thể hệ T0 [11], chúng tôi đã thu được

tổng số 10 dòng có tỷ lệ phân li gen chuyển là 3:1. Trong số đó, có 6 dòng thuộc giống K326 và 4 dòng thuộc giống C9-1 (bảng 1). Ở cấu trúc RNAi TCYS, với 20 dòng thuốc lá T0

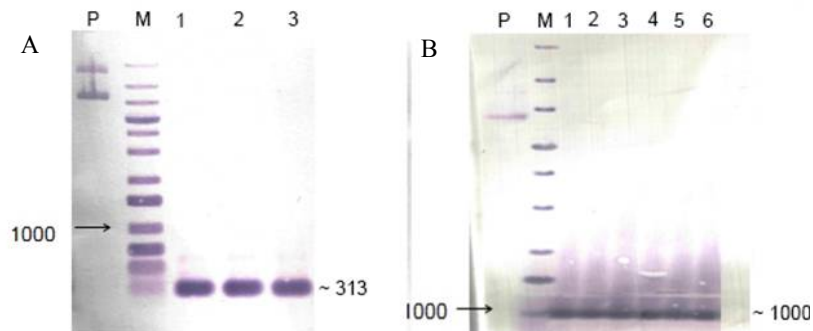
không biểu hiện bệnh virus [12], chúng tôi đã thu được 4 dòng thuốc giống K326 và 2 dòng thuốc giống C9-1 có tỷ lệ phân li gen chuyển là 3:1. Các dòng thuốc lá chuyển gen còn lại cho

tỷ lệ phân li là 15:1 hoặc không xác định được tỷ lệ phân li của gen chuyển (kết quả không được chỉ ra trong bài báo này).



Hình 1. Hình ảnh sàng lọc thuốc lá T1 chuyển gen trên môi trường chọn lọc mannose

TMV-K2: Cây thuốc lá chuyển gen T1 trên môi trường có mannose 30 mg/l; WT-1: Cây thuốc lá không chuyển gen trên môi trường không có mannose; WT-2: Cây thuốc lá không chuyển gen trên môi trường có mannose 30 mg/l.



Hình 2. Kết quả phân tích Southern blot sản phẩm PCR gen chuyển CP TMV (A) và TCYS (B) trong các dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T1

P: plasmid; M: Marker 1 kb plus; A (1-3): tương ứng với các dòng chuyển gen T1 là TMV-K10, TMV-K18, TMV-C12; B (1-6): tương ứng với các dòng chuyển gen T1 là TCYS-K06, K07, K18, K20, C12, C17.



Hình 3. Hình ảnh triệu chứng bệnh trên cây thuốc lá sau lây nhiễm TYLCV và TSWV
a: cây WT nhiễm virus TYLCV và TSWV; b: cây TCYS-K06 biểu hiện triệu chứng bệnh xoắn ngọn; c: cây TCYS-K07 không biểu hiện triệu chứng bệnh.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng PCR và lai Southern blot

Để chắc chắn các cây sống sót trên môi trường chọn lọc mannose trong thí nghiệm phân tích sự phân li gen chuyển đều có mang gen đích (không phải chỉ mang gen chọn lọc), tiến hành chọn ngẫu nhiên một số cây để thực hiện phản ứng PCR bằng cặp mồi đặc hiệu với gen đích, sau đó lai với đoạn DNA dò của gen.

Kết quả thể hiện trên hình 2 cho thấy, ở cả hai cấu trúc RNAi TMV và RNAi TCYS, tất cả các cây sinh trưởng tốt trên môi trường chọn lọc mannose đều xuất hiện băng vạch với kích thước gen chuyển đúng theo lý thuyết (gen CP của TMV là 313 bp, đoạn gen TCYS là 1.000 bp) sau khi được khuếch đại bằng phản ứng PCR và lai Southern blot. Kết quả này khẳng định gen đích đã chuyển vào cây thuốc lá và đã di truyền sang thế hệ T1.

Đánh giá tính kháng virus của các dòng cây chuyển gen

Hai mươi cây thuộc 10 dòng thuốc lá chuyển cấu trúc RNAi TMV có tỷ lệ phân li gen chuyển 3:1 được trồng trong nhà lưới và kiểm tra tính kháng virus thông qua lây nhiễm nhân tạo với TMV. Kết quả thống kê trong bảng 2 cho thấy, với mỗi dòng chuyển gen đều thu được từ 1-4 cây không biểu hiện triệu chứng bệnh sau 3 lần lây nhiễm, tương ứng với tỷ lệ kháng hoàn toàn với TMV là 5-20%. Kết quả này thấp hơn so với tỷ lệ kháng thu được ở thế hệ T1 [11]. Song, ngoài các cây biểu hiện tính

kháng hoàn toàn ở mỗi dòng, các cây chuyển gen còn lại vẫn thể hiện khả năng kháng nhất định với TMV. Cụ thể là, không có cây chuyển gen nào biểu hiện bệnh ở mức 4, chỉ có từ 1-4 cây ở mỗi dòng biểu hiện bệnh ở mức độ 3. Còn lại, đa số các cây (9-13 cây trên tổng số 20 cây ở mỗi dòng) vết khảm chỉ xuất hiện ở một vài điểm trên bề mặt lá, không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây. Kết quả này chứng tỏ, các dòng chuyển gen tiếp tục biểu hiện khả năng kháng bệnh virus ở thế hệ T1.

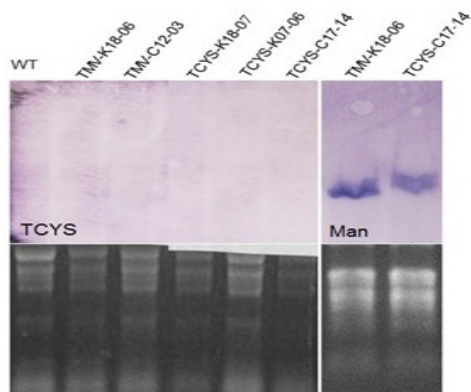
Với 4 dòng K326 và 2 dòng C9-1 mang cấu trúc RNAi TCYS, kết quả đánh giá tính kháng với 4 virus trình bày trong bảng 3 cho thấy, tất cả các dòng chuyển gen đều thu được các cây không biểu hiện triệu chứng bệnh của từng virus hay đồng thời của 2 virus TMV và CMV hoặc TYLCV và TSWV. Tuy nhiên, kết quả thống kê tính kháng trên cả 4 virus cho thấy, chỉ có 2 dòng thuộc giống K326 là TCYS-K07, TCYS-K18 và 1 dòng C9-1 là TCYS-C17 có cây không biểu hiện triệu chứng của cả bốn bệnh do TMV, CMV, TYLCV và TSWV gây ra. Kết quả này chỉ ra, các dòng thuốc lá chuyển gen đa đoạn ở thế hệ T1 vẫn có khả năng kháng virus song mức độ kháng là khác nhau. Sự sụt giảm tỷ lệ kháng virus phổ rộng ở các dòng thuốc lá chuyển gen thế hệ T1 so với T0 có thể liên quan đến hiện tượng tái tổ hợp và đứt gãy của các đoạn gen virus trong cấu trúc RNAi [15] hay sự xuất hiện của chủng virus mới tại thời điểm lây nhiễm.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính kháng TMV của các dòng thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi TMV ở thế hệ T1

Dòng T0	Số cây T1 kiểm tra	Số cây nhiễm bệnh trong mỗi dòng ở các mức độ biểu hiện bệnh khác nhau					Tỷ lệ kháng (%)
		0	1	2	3	4	
TMV-K02	20	2	10	6	2	0	10
TMV-K04	20	1	12	5	4	0	5
TMV-K10	20	2	9	6	3	0	10
TMV-K13	20	1	11	6	3	0	5
TMV-K18	20	4	10	5	1	0	20
TMV-K23	20	3	12	4	1	0	15
TMV-C03	20	1	10	5	4	0	5
TMV-C05	20	1	11	5	3	0	5
TMV-C10	20	2	12	4	2	0	10
TMV-C12	20	2	13	5	0	0	10

Bảng 3. Kết quả đánh giá tính kháng virus phổ rộng của các dòng thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi TCYS ở thế hệ T1

Dòng T0	Số cây T1 KT	Virus lây nhiễm	Số cây nhiễm bệnh trong mỗi dòng ở các mức độ biểu hiện bệnh khác nhau					Số cây kháng đồng thời 2 virus	Số cây kháng 4 virus
			0	1	2	3	4		
TCYS-K06	20	TMV	10	5	3	2	0	7	0
		CMV	11	6	2	1	0		
		TYLCV	4	8	4	2	2	3	
		TSWV	5	8	5	2			
TCYS-K07	20	TMV	11	6	2	1	0	7	1
		CMV	12	4	3	1	0		
		TYLCV	4	7	5	3	1	4	
		TSWV	6	8	4	2	-		
TCYS-K18	20	TMV	13	4	2	1	0	9	1
		CMV	13	5	2	0	0		
		TYLCV	6	8	4	1	1	4	
		TSWV	7	9	3	1	-		
TCYS-K20	20	TMV	9	6	3	2	0	6	0
		CMV	9	7	2	2	0		
		TYLCV	4	8	4	3	1	3	
		TSWV	5	8	5	2	-		
TCYS-C12	20	TMV	10	6	2	2	0	7	0
		CMV	12	5	3	0	0		
		TYLCV	5	7	5	2	1	2	
		TSWV	5	8	6	1	-		
TCYS-C17	20	TMV	12	5	3	2	0	8	1
		CMV	12	6	1	1	0		
		TYLCV	6	8	4	1	1	4	
		TSWV	7	9	3	1	-		



Hình 4. Kết quả lai Northern blot các mẫu thuốc lá chuyển gen (trên) cùng ảnh gel agarose điện di RNA (dưới) với 40 µg RNA tổng số mỗi mẫu

TCYS: mẫu dò TCYS; Man: mẫu dò manose; WT: cây không chuyển gen; (TMV-K18-06, TMV-C12-03): cây chuyển gen T1 mang cấu trúc RNAi TMV; (TCYS-K18-07, TCYS-K07-06, TCYS-C17-14): cây chuyển gen T1 mang cấu trúc RNAi TCYS.

Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện của gen chuyển bằng lai Northern blot

Tính kháng virus của các dòng thuốc lá chuyển gen được hình thành dựa trên cơ chế RNAi. Để chứng minh cơ chế RNAi hoạt động sau sao mã, phương pháp Northern blot được sử dụng để kiểm tra mRNA của các gen chuyển. Trong cấu trúc chuyển gen, vùng LB đến RB có 2 gen được điều khiển bởi 2 promoter khác nhau: Gen kháng virus được điều khiển bởi promoter 35S và gen *manA* điều khiển bởi

promoter CMPS. Vì cùng nằm trên 1 cassette mà cả 2 cùng hoạt động (gen chọn lọc và gen kháng virus) nên có thể so sánh khả năng hoạt động của 2 gen này bằng phương pháp lai Northern blot. Trong phương pháp này, RNA tổng số của các mẫu lá kháng bệnh được lai với mẫu dò TCYS (đôi với phân tích gen chuyển) hoặc *manA* (đôi với mẫu đối chứng).

Kết quả lai cho thấy, với mẫu dò *manA*, thu được băng rõ nét, tương ứng với tính toán lí thuyết (hình 4). Điều đó chứng tỏ gen *manA* hoạt động rất tốt. Tuy nhiên, với mẫu dò TCYS thì ngược lại, âm tính ở tất cả các mẫu mặc dù hàm lượng RNA giống nhau. Từ kết quả này có thể khẳng định, đoạn TCYS đã bị cắt vụn theo cơ chế RNAi.

KẾT LUẬN

Kết quả phân tích phân tử và đánh giá tính kháng virus cho thấy, đã có 10 dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi TMV và 6 dòng mang cấu trúc RNAi TCYS có tỷ lệ phân li gen chuyển là 3:1. Thí nghiệm đánh giá tính kháng virus của các dòng chuyển gen này thu được kết quả là: tỷ lệ kháng hoàn toàn với TMV ở 10 dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi TMV là 5-20%; tỷ lệ kháng hoàn toàn với 4 virus TMV, CMV, TYLCV, TSWV của 3 dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi TCYS (TCYS-K07, TCYS-K18 và TCYS-C17) là 5% và tỷ lệ này là 0% ở 3 dòng TCYS-K06, TCYS-K20 và TCYS-C12. Kết quả này chứng tỏ, gen chuyển tiếp tục được di truyền và biểu hiện ở các dòng thuốc lá chuyển gen thế hệ T1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abhary M. K., Anfoka G. H., Nakhla M. K., Maxwell D. P., 2006. Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the tomato yellow leaf curl virus complex. *Arch Virol.*, 151: 2349-2363.
2. Bucher E, Lohius D, van Poppel PM, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, Prins M., 2006. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J. Gen. Virol.*, 87: 697-701.
3. Herbers K., Meuwly P., Frommer W. B, Metraux J. P, Sonnewald U., 1996. Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell.*, 8(5): 793-803.
4. Hu Q., Niu Y., Zhang K., Liu Y., Zhou X., 2011. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Virology Journal.*, 8: 41-52.
5. Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A., 2015. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci.*, 6, doi: 10.3389/fpls.2015.00208.
6. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kurska K., Olszak P.H., Czubačka A., 2013. A survey of Nicotiana germplasm for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV). *Euphytica*, 193: 207-219.
7. Leibman D., Prakash S, Wolf D., Zelcer A., Anfoka G., Haviv S., Brumin M., Gaba V., Arazi T., Lapidot M., Gal-On A., 2015. Immunity to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato is associated with accumulation of transgene small RNA. *Arch Virol.*, 160(11): 2727-2739.
8. Lin C. Y., Ku H. M., Chiang Y. H., Ho H. Y., Yu T. A., Jan F. J., 2012. Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic Res.*, 21(5): 983-993.
9. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. A., 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.*, 2: 279-289.
10. Ntui V. O., Kynet K., Azadi P., Khan R. S., Chin D. P., Nakamura I., Mii M., 2013. Transgenic accumulation of a defective cucumber mosaic virus (CMV) replicase derived double stranded RNA modulates plant defence against CMV strains O and Y in potato. *Transgenic Res.*, 22(6): 1191-1205.
11. Lê Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm

- Thị Vân, Lê Văn Sơn, 2013. Thiết kế vector chuyển gen kháng virus mang gen chọn lọc thân thiện với môi trường. Tạp chí Sinh học, 35(3se): 188-194.
12. Lê Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn, 2014. Tạo cây thuốc lá mang gen đa đoạn kháng virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV bằng kỹ thuật RNAi. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN 30(3): 58-67.
13. Nguyễn Thị Hải Yến, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình, 2011. Tạo dòng cà chua P18 kháng bệnh xoắn vàng lá do virus bằng kỹ thuật RNAi. Tạp chí Công nghệ sinh học, 9(3): 333-340.
14. Wang S., Wu H., Qiao J., Ma L., Liu J., Xia Y., Gao X., 2009. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. J. Microbiol. Biotechnol., 19(10): 1250-1258.
15. Zhang X., Sato S., Ye X., Dorrance A. E., Morris T. J., Clemente T. E., Qu F., 2011. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. Phytopathology., 101(11): 1264-1269.
16. Zhou Y., Yuan Y., Yuan F., Wang M., Zhong H., Gu M., Liang G., 2012. RNAi-directed down-regulation of RSV results in increased resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Biotechnol Lett., 34: 965-978.

EVALUATION THE VIRUS RESISTANCE STABILITY OF T1 TRANSGENIC TOBACCO LINES CARRYING RNAi TMV AND RNAi TCYS CONSTRUCT

Le Thi Thuy², Pham Thi Van¹, Nguyen Van Doai¹, Lam Dai Nhan¹, Le Van Son¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Hanoi National University of Education

SUMMARY

Creating antiviral transgenic plants using RNAi technique is a modern and effective method to significantly reduce yield losses by plant viral diseases. In the previous publication, we had created some K326 and C9-1 transgenic tobacco lines containing RNAi TMV and RNAi TCYS construct with completely resisting to virus. In this study, the stability of transgene structure and virus resistance ability in the transgenic tobacco lines continue to be evaluated in the T1 generation. The results showed that the ten transgenic lines carrying RNAi TMV construct and 6 lines carrying RNAi TCYS are transgene segregation ratio of 3:1. PCR analyses using specific primers combined Southern blot analyses, combined Northern blot analyses proved the heredity and activity of transgene in both of K326 and C9-1 transgenic tobacco lines. The result of resistant test by virus infection of 10 lines containing RNAi TMV construct revealed that all of them completely resist to TMV with resistant ratio ranged from 5% to 20%. In RNAi TCYS construct, there were 3 lines with 3 individual plants completely resisting to four virus (TMV, CMV, TYLCV and TSWV) in population of 120 individual plants of 6 lines. The results of this study showed that the virus resistance transferred to T1 generation, opening opportunity to develop antiviral transgenic tobacco varieties in our country.

Keywords: RNA interference, tobacco, tobacco mosaic virus, virus infection, virus resistance.

Ngày nhận bài: 30-3-2016