

CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN MANG CẤU TRÚC RNAi KHÁNG ĐỒNG THỜI HAI LOẠI VIRUS GÂY BỆNH KHÂM

Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Bệnh khảm do virus tobacco mosaic virus (TMV) và cucumber mosaic virus (CMV) gây ra là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng làm giảm năng suất và chất lượng cho nhiều loài cây trồng như cà chua, khoai tây, thuốc lá, cây tiêu... Để tạo ra cây thuốc lá kháng đồng thời hai virus tobacco mosaic virus (TMV) và cucumber mosaic virus (CMV) bằng kỹ thuật RNAi (RNA interference), một đoạn gen CP đa đoạn-CPi (305 bp từ vị trí nucleotide 159 - 463 gen CP TMV + 313 bp từ vị trí nucleotide 315 - 627 gen CP CMV) đã được chọn cho thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc ihpRNA (intron hairpin RNA, ihpRNA). Cấu trúc này đã được chuyển vào cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* giống K326 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả phân tích PCR, RT-PCR và ELISA đã chứng minh đoạn gen đa đoạn CPi đã được chuyển vào genome thuốc lá và dẫn tới sự vắng mặt của TMV và CMV trong các dòng thuốc lá chuyển gen. Kết quả đánh giá sau ba lần lây nhiễm nhân tạo cùng lúc với TMV và CMV cho thấy tỷ lệ các dòng chuyển gen T0 kháng hoàn toàn trên tổng số các dòng kiểm tra là 34/48 (70,8%).

Từ khóa: Cây chuyển gen, cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), RNAi (RNA interference), virus khảm dưa chuột (CMV), tobacco mosaic virus (TMV)

MỞ ĐẦU

Bệnh khảm do virus tobacco mosaic virus (TMV) và cucumber mosaic virus (CMV) gây ra là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng làm giảm năng suất và chất lượng cho ít nhất 199 loài trong 35 họ (TMV) (Shew, Lucas, 1991) và hơn 800 loài trong 85 họ (CMV) (Falk, Hull, 2004) thực vật khác nhau, trong đó thuốc lá là một trong những đối tượng chịu thiệt hại lớn nhất có thể lên tới 100% (Nguyễn Văn Chín, Nguyễn Ngọc Bích, 2008). Vì vậy, việc nghiên cứu tạo cây trồng có khả năng kháng đồng thời TMV và CMV sẽ có ý nghĩa ứng dụng lớn đối với sản xuất nông nghiệp của Việt Nam.

Kỹ thuật di truyền là một công cụ quan trọng trong công cuộc chọn tạo giống cây trồng mang tính trạng mong muốn như màu sắc mới, chất lượng tốt hơn, đặc biệt kháng lại các tác nhân gây bệnh do virus và côn trùng (Hammond *et al.*, 2006). Trong đó, kỹ thuật RNAi đang được quan tâm nhiều và ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu tạo cây trồng chuyển gen kháng lại một số loài virus gây bệnh ở thực vật.

RNAi là cơ chế gây bất hoạt gen sau phiên mã (post-transcriptional gene silencing, PTGS) nhằm chống lại sự xâm nhập của các nucleic acid ngoại lai (thường có nguồn gốc từ virus) cũng như điều khiển sự biểu hiện gen nội bào (Herr, 2005). RNAi hoạt

động thông qua trung gian là các phân tử RNA sợi kép (double stranded RNA, dsRNA) (Meister, Tuschl, 2004) bằng việc phân cắt dsRNA bởi enzyme RNase III - gọi là Dicer (Bernstein *et al.*, 2001) để tạo thành các phân tử RNA ức chế nhỏ (small interfering RNA, siRNA) có kích thước khoảng 21 - 26 nucleotide (Hamilton, Baucombe, 1999). Các sợi siRNA gắn kết với một phức hệ protein cảm ứng RNA (RNA induce silencing complex, RISC) sẽ bắt cặp một cách đặc hiệu với các phân tử RNA đích (mRNA hay RNA của virus) và tạo cơ hội cho enzyme nuclease của RISC phân hủy RNA đích (Bernstein *et al.*, 2001). Ở thực vật, RNAi có thể được tạo ra một cách nhân tạo bằng cách chuyển gen có cấu trúc biểu hiện sự phiên mã cao như RNA sense, anti-sense chứa trình tự tương đồng với gen đích. Đặc biệt, hiệu quả RNAi sẽ tăng rất cao nếu chuyển gen tạo cấu trúc RNA tự bắt cặp hay còn gọi là cấu trúc kẹp tóc (hairpin RNA, hpRNA) (Smith *et al.*, 2000).

Bằng chứng đầu tiên về sự kháng virus thông qua RNAi được cung cấp bởi Waterhouse và đồng tác giả (1998), kháng lại virus PVY (*Potato virus Y*) trong cây thuốc lá chuyển gen. Cho tới nay, đã có rất nhiều thành công trên nhiều hệ thống vật chủ khác để kháng lại một vài loại virus (Abhary *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2006; Phạm Thị Vân *et al.*, 2008).

TMV và CMV có genome là RNA đơn dương

được chia thành nhiều khung đọc mở khác nhau. Trong đó, khung đọc mở mã hóa cho protein vỏ (coat protein, CP) của TMV có vai trò cần thiết cho quá trình hình thành virion và có thể điều khiển tạo ra protein di chuyển (movement protein, MP) vì vậy điều khiển sự lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác của virus (Kawakami *et al.*, 2004), còn CP của CMV đóng một vai trò cần thiết trong sự di chuyển virus, vector truyền bệnh và sự phân hóa triệu chứng (Callaway *et al.*, 2001). Vai trò này của gen CP cũng cho phép sử dụng gen CP làm nguyên liệu cho tạo cây trồng chuyển gen kháng virus TMV và CMV bằng cơ chế RNAi (Chen *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2007).

Dựa vào kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền của CMV và TMV gây bệnh trên cây thuốc lá trồng tại vùng chuyên canh Việt Nam (Lê Trần Bình, 2006), đoạn gen CP có độ bảo thủ cao của TMV và CMV sử dụng làm nguyên liệu chuyển gen trong nghiên cứu này, nhằm tạo ra các dòng thuốc lá có khả năng kháng đồng thời hai virus TMV và CMV. Kết quả nghiên cứu sẽ được trình bày dưới đây.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Nguồn gen CP của TMV và CMV

Plasmid pTZ57R/T và pGEM[®]-T lần lượt mang vùng gen mã hóa cho CP của virus TMV và CMV thu thập tại Cao Bằng (AM048830) và Bắc Giang (AM412008).

Các bộ kit và vector

Vector chuyển gen pK7GWIWG2(II) (Karimi *et al.*, 2002), bộ kit nhân dòng pENTR[™] Directional TOPO[®] Cloning Kit (Invitrogen), bộ kit thực hiện phản ứng Gateway Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme mix Kit (Invitrogen),

Chủng vi khuẩn

E. coli One Shot[®] TOP 10 (Invitrogen), chủng *Agrobacterium tumefaciens* CV58C1 mang plasmid gây độc pGV2260.

Nguồn thuốc lá

Các mảnh lá thuốc lá *Nicotiana tabacum* giống K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in-vitro* (Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế môi RNAi

Để khuếch đại vùng gen CP quan tâm của TMV và CMV và ghép nối hai vùng gen này với nhau, các môi RNAi đã được thiết kế với môi TMV-Fi được bổ sung thêm 4 nucleotide CACC tương thích với đầu 3' GTGG của vector nhân dòng pENTR[™]/D-TOPO[®] (Invitrogen) còn hai môi TMV-CMV-Fi và TMV-CMV-Ri có 20 nucleotide gối lên nhau (10 nucleotide đầu 5' là của TMV còn 10 nucleotide đầu 3' là của CMV).

Việc thiết kế môi được thực hiện tại những vùng có độ bảo thủ cao nhất, vì vậy, ngoài việc dựa vào các trình tự gen CP đã có, chúng tôi còn dựa vào các trình tự gen CP của TMV và CMV đã được đăng ký vào Ngân hàng dữ liệu gen để tìm ra những vùng có độ bảo thủ cao nhất.

Thiết kế vector chuyển gen thực vật mang cấu trúc RNAi

Kỹ thuật Gateway (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) được sử dụng để tạo cấu trúc RNAi. Đầu tiên, phản ứng PCR nhân từng đoạn gen CPi TMV và CMV. Sản phẩm của phản ứng được tinh sạch phục vụ cho phản ứng PCR ghép nối hai đoạn gen lại với nhau. Đoạn gen CPi ghép nối tiếp tục được dòng hóa vào vector pENTR/D để tạo ra dòng entry pENTR/D mang CPi (ký hiệu: pENT-CCPi) có chứa các vị trí tái tổ hợp *attL*. Dòng khuẩn lạc mang pENT-CCPi được nuôi và tinh sạch plasmid phục vụ đọc trình tự trên máy đọc tự động.

Tiếp đó, phản ứng LR (LR là phản ứng tái tổ hợp giữa các vị trí *attL* and *attR* được xúc tác bởi enzyme LR Clonase[™] II) được thực hiện giữa vector entry pENT-CCPi và vector tiếp nhận destination pK7GWIWG2(II) có chứa các vị trí gắn kết *attR*. Kết quả phản ứng LR sẽ tạo ra một vector biểu hiện thực vật nhị thể pGWT-CCPi mang cấu trúc RNAi với hai vị trí chèn đoạn gen CPi theo chiều sense và antisense được ngăn cách bởi một đoạn intron dưới sự điều khiển của promoter 35S cauliflower mosaic virus. Cấu trúc pGWT-CCPi được dòng hóa trong tế bào *E. coli* One Shot[®] TOP 10. Chọn lọc các khuẩn lạc dương tính trên môi trường LB có bổ sung streptomycin 40 mg/l, spectinomycin 100 mg/l và chloramphenicol 50 mg/l. Sau khi chọn dòng trong tế bào *E. coli* bởi hai phản ứng colony-PCR (một môi trên gen CMV-Ri-2 và một trong hai môi trên vector P35SF2 (5'- CACTATCCTTCGCAAGAC - 3')/T35SR (5'- GGGAACTACTACCACATTA -3'))

và phản ứng cắt bởi enzyme hạn chế *Xba*I và *Hind*III, pGWT-CCPi được chuyển nạp vào tế bào *A. tumefaciens* chủng CV58C1 pGV2260 bằng phương pháp xung điện.

Chuyển cấu trúc RNAi T-CMV-CPi vào cây thuốc lá

Cấu trúc RNAi T-CMV-CPi trong vector nhệ thể pGWT-CCPi được chuyển vào cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* giống K326 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58C1 theo phương pháp của Topping có cải tiến (Topping, 1998).

Đánh giá tính kháng virus của các dòng thuốc lá chuyển gen T0 bằng lây nhiễm nhân tạo

Các dòng cây chuyển gen T0 sau khi trồng ngoài nhà lưới cao khoảng 10 - 30 cm, chiều dài kích thước lá trên 10 cm được kiểm tra tính kháng virus bằng phương pháp lây nhiễm virus nhân tạo (Herbers *et al.*, 1996). Các bước tiến hành như sau: Mẫu lá bị bệnh (TMV và CMV) được nghiền trong đệm phosphat 100mM pH7 (~1 g mẫu lá trong 20 ml đệm). Lá lây nhiễm được gây tổn thương nhẹ bằng carborundum (SiC). Cho dịch virus lên phần lá đã gây xước, sau vài phút rửa lá bằng nước. Sau 8 - 11 ngày lây nhiễm, triệu chứng sẽ xuất hiện trên cây. Cây Wild-type *N. tabacum* (WT) - cây không chuyển gen cũng được lây nhiễm để làm đối chứng dương. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành lây nhiễm ba lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần và các cây sau khi lây nhiễm có biểu hiện bệnh sẽ không sử dụng để lây nhiễm lần sau.

Xác định sự có mặt của virus trên dòng thuốc lá T0 bằng ELISA

Phản ứng indirect ELISA được thực hiện dùng kỹ thuật bẫy kháng thể trước (plate-trapped antigen, PTA-ELISA) với kháng huyết thanh TMV và CMV thô theo phương pháp của Mowat và Dawson (1987).

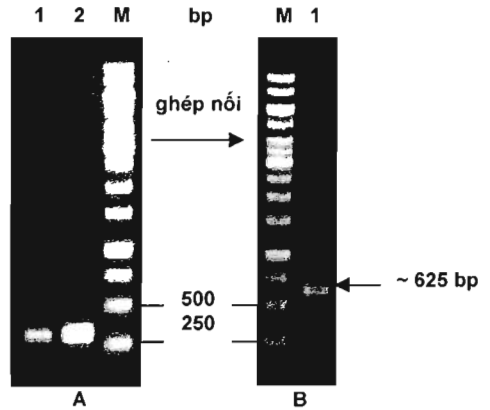
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi TMV-CMV-CP

Dựa vào các môi đã thiết kế, đoạn gen CPi dài 305 bp (từ vị trí nucleotide 159 - 463 gen CP) của TMV đã được nhân lên bằng cặp môi đặc hiệu TMV-Fi (5'- CACCATGAAACCTTCACCACA - 3'), TMV-CMV-Ri (5'- AATTTGAATGCGGGT CCAAACCAAACCAGA -3'), và 313 bp (từ vị trí

nucleotide 315 - 627 gen CP) của CMV được nhân lên bằng cặp môi TMV-CMV-Fi (5'- TTGGTTTGGACCCGC ATTCAAATTCGAGTT - 3') và CMV-Ri-2 (5'- CTAACGTTGGTGCTC GATGTC -3') (Hình 1A).

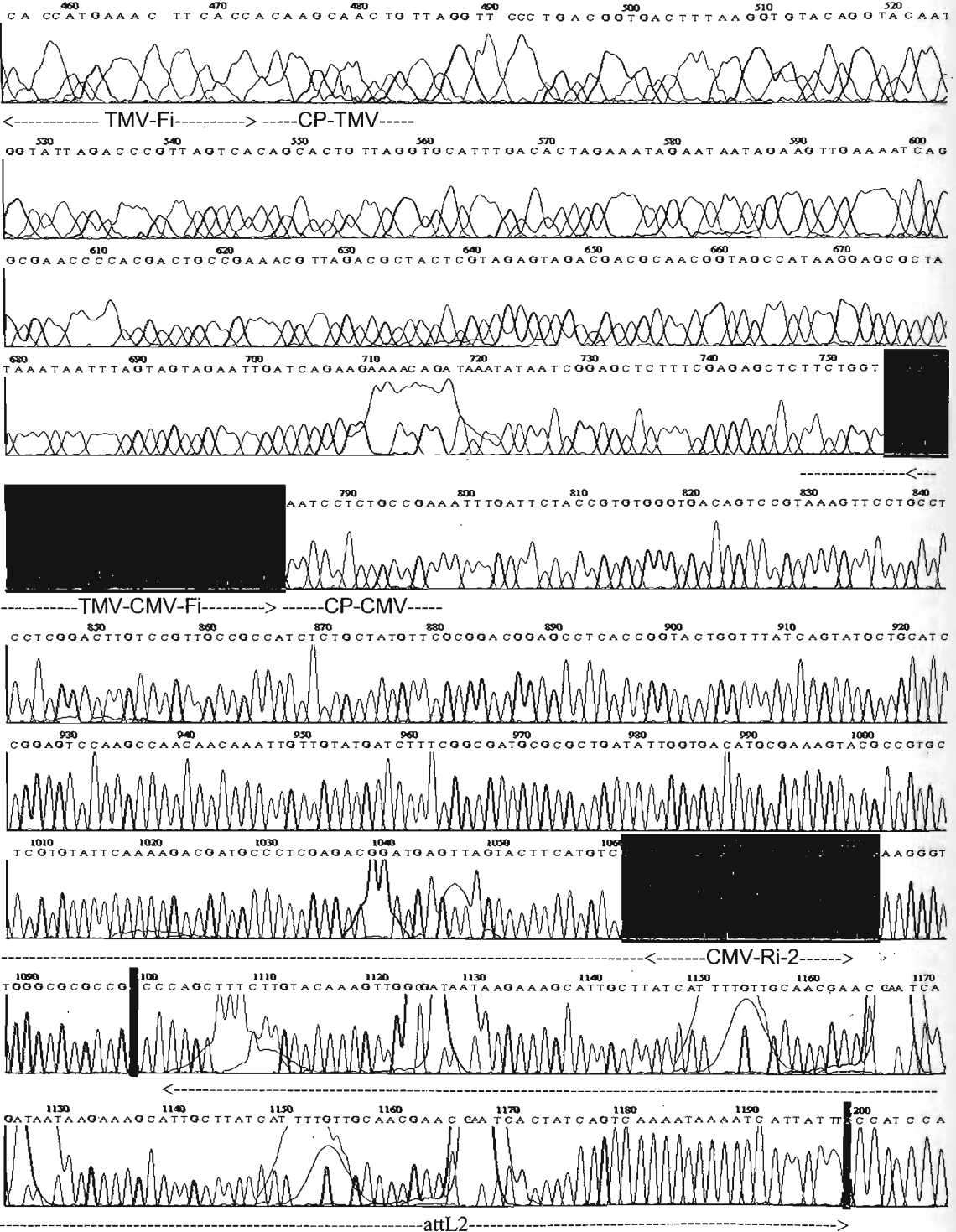
Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen được ghép nối trên gel agarose 1% (Hình 1B) đã thu được một băng DNA rất đặc hiệu, có kích thước khoảng 625 bp, tương ứng với kích thước được dự đoán khi thiết kế môi. Đoạn gen này tiếp tục được đồng hóa thành công trong vector pENTR/D. Những dòng khuẩn lạc dương tính với phản ứng colony PCR đã được chọn để tách plasmid làm mẫu cho phản ứng đọc trình tự và LR.



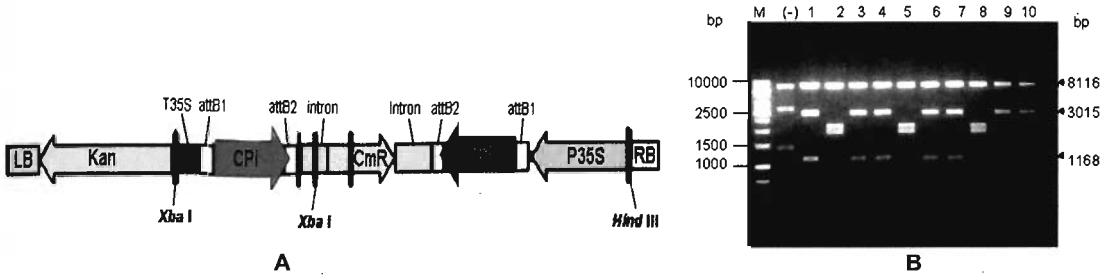
Hình 1. Điện di sản phẩm PCR nhân CPi của TMV và CMV. M. Thang Marker DNA chuẩn 1 kb; A. Nhân từng đoạn riêng rẽ (1. TMV; 2. CMV); B. Ghép nối hai đoạn.

Để xác định đoạn ghép nối có phải là của TMV và CMV hay không một dòng khuẩn lạc đã được tách chiết plasmid để thực hiện phản ứng đọc trình tự tự động. Kết quả đọc và phân tích trình tự (Hình 2) đã chứng tỏ phân đoạn thu được chính là đoạn ghép nối hai vùng gen CPi của TMV và CMV nghiên cứu, kích thước của phân đoạn này là 625 bp. Ngoài ra, việc xác định trình tự cũng đã cho thấy các vị trí attL1 và attL2 không bị lỗi đảm bảo cho phản ứng LR Gateway xảy ra chính xác.

Kỹ thuật Gateway là một phương pháp hiệu quả cho phép thực hiện nhanh và dễ dàng việc gắn một đoạn DNA vào và chuyển đoạn DNA giữa các vector trong hệ thống. Trong nghiên cứu này, phản ứng LR trong Gateway được thực hiện giữa plasmid entry pENT-CCPi và vector tiếp nhận pK7GWIWG2(II) dưới sự xúc tác bởi enzyme LR ClonaseTM II để tạo vector chuyển gen thực vật nhệ thể mang cấu trúc RNAi pGWT-CCPi (Hình 3A).



Hình 2. Kết quả xác định trình tự đoạn ghép nối TMV-CMV-CPI trên vector pENTRTM/D-TOPO.



Hình 3. A. Bản đồ cấu trúc pGWT-CCPi: P35S, promoter 35S của Cauliflower mosaic virus; 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. Vị trí các điểm cắt hạn chế của enzyme *Xba*I và *Hind*III; CPI, đoạn gen CP ghép nối của virus TMV và CMV. **B.** Điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pGWT-CCPi bằng enzyme *Xba*I và *Hind*III. M. Thang DNA chuẩn Smartladder; 1 – 10. Dòng khuẩn lạc 1 – 10; (-). Đối chứng âm vector pK7GWIWG2(II).

Kết quả chọn dòng bằng phản ứng colony-PCR (không dẫn hình) và phản ứng cắt bởi enzyme hạn chế (Hình 3B) đã thu được dòng khuẩn lạc mang vector pGWT-CCPi quan tâm, với hai đoạn CPI lặp lại đảo chiều, được ngăn cách bởi một đoạn intron ở giữa dưới sự điều khiển của promoter 35S (Hình 3A). Cấu trúc này sẽ tạo ra RNA CPI dạng kẹp tóc bổ sung chính nó - ihpRNA sau khi được chuyển vào cây trồng. Khả năng cấu trúc ihpRNA bổ sung chính nó có hiệu quả làm bất hoạt gen ở thực vật đã được Smith và đồng tác giả (2000) chứng minh. Cấu trúc RNAi pGWT-CCPi này tiếp đó được dòng hóa thành công vào tế bào *A. tumefaciens*.

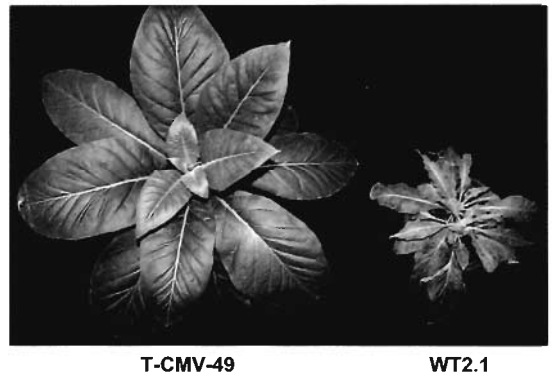
Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi T-CMV-CPI

Với 30 mảnh lá thuốc lá được biến nạp cấu trúc RNAi T-CMV-CPI, sau các giai đoạn nuôi cấy và chọn lọc thu được 105 dòng thuốc lá T0 sống sót trên môi trường RM có kháng sinh kanamycin 50 mg/l. Tiếp tục chọn ngẫu nhiên 50 dòng thuốc lá T0 để ra bầu cát: trâu và bầu đất. Kết quả thu được 48/50 dòng cây sống sót để đánh giá tính kháng đối với 2 loại virus TMV và CMV (Bảng 1).

Đánh giá tính kháng bệnh của các dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi T-CMV-CPI thế hệ T0

+ **Đánh giá bằng lây nhiễm nhân tạo virus:** Điều quan trọng nhất của nghiên cứu này là tạo ra được những dòng thuốc lá chuyển gen có khả năng kháng virus TMV. Vì vậy, để kiểm tra tính kháng, 48 dòng thuốc lá chuyển gen và 10 cây đối chứng WT2 không chuyển gen đã được lây nhiễm nhân tạo đồng thời hai loại virus TMV và CMV qua ba lần, mỗi lần cách nhau 15 ngày. Sau mỗi lần lây nhiễm virus, các dòng thuốc lá được quan sát sự biểu hiện bệnh virus bằng cảm quan.

Theo kết quả thống kê ở bảng 2, tỷ lệ kháng hoàn toàn của các dòng thuốc lá chuyển cấu trúc RNAi T-CMV-CPI tương đối cao (70,8% = 34 cây kháng/48 dòng kiểm tra). Những dòng cây biểu hiện bệnh do nhiễm cả hai loại virus này đều rất còi cọc, thân lá hơi bầu, đầu lá nhọn và vừa khảm da ếch vừa khảm loang lổ (Hình 4).



Hình 4. Hình ảnh dòng thuốc lá T-CMV-49 biểu hiện kháng bệnh hoàn toàn và cây đối chứng WT2-1 sau 3 lần lây nhiễm.

+ **Đánh giá bằng PCR và RT-PCR:** Sau ba lần lây nhiễm 34 dòng thuốc lá chuyển gen có biểu hiện kháng TMV và CMV hoàn toàn đã được xác định sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen bằng phản ứng PCR và sự hoạt động phiên mã ra RNA của gen chuyển bằng phản ứng RT-PCR. Kết quả tất cả 42 dòng đều dương tính với PCR và RT-PCR (không dẫn hình) đã chứng tỏ đây là những dòng chuyển gen thành công mang cấu trúc RNAi T-CMV-CPI hoạt động.

+ *Đánh giá bằng ELISA*: RNAi trong cây chuyển gen sẽ phân hủy RNA của virus xâm nhập dẫn tới không hình thành các phân tử virus mới hoặc hàm lượng phân tử virus sẽ bị giảm đáng kể. Để kiểm tra sự có mặt của phân tử TMV và CMV trong cây chuyển gen, 24/34 dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi có biểu hiện kháng hoàn toàn TMV và CMV và 5/10 cây WT2 đã được chọn ngẫu nhiên để thử ELISA. Kết quả cho thấy, cả 24 dòng cây kiểm tra đều cho phản ứng âm tính với ELISA (Bảng 3), chứng tỏ virus đã bị bất hoạt sau khi lây nhiễm.

Cơ chế kháng thông qua RNA đã được mô tả xảy ra nhiều trong các cây trồng chuyển gen CP đơn đoạn của một loại virus như Sweet potato feathery mottle virus (Sonoda *et al.*, 1999), TMV (Yan *et al.*, 2007), CMV (Chen *et al.*, 2004) nhưng lại ít trên các cây trồng chuyển gen đa đoạn CP. Vì vậy, bài báo này đã cung cấp thêm dữ liệu nghiên cứu về cơ chế kháng qua RNA trên cây thuốc lá chuyển gen CP đa đoạn nhằm mục đích tạo tính kháng cùng lúc hai loại virus TMV và CMV.

Trong những nghiên cứu trước đây, chúng tôi cũng đã tạo được các dòng thuốc lá chuyển gen T0 đơn đoạn CP của từng virus TMV (305 nucleotide đầu 3' tương ứng từ vị trí nucleotide 159 - 463 gen CP) và CMV (337 nucleotide đầu 3' tương ứng từ vị trí 315 - 651 gen CP). Hiệu quả kháng đối với cấu trúc gen đơn đoạn này tương đối cao 87,5% đối với TMV và 71% đối với CMV. Tuy nhiên, mỗi cây trồng có thể nhiễm nhiều loại virus khác nhau, chẳng hạn, thuốc lá có thể nhiễm virus TMV, CMV, PVY hay TYLCV... nên việc tạo ra cây trồng có khả năng kháng được nhiều loại virus cùng lúc là mục tiêu của nhiều nhà nghiên cứu tạo giống. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm việc tạo các dòng thuốc lá mang cấu trúc gen CP đa đoạn (305 bp từ vị trí nucleotide 159 - 463 gen CP TMV + 313 bp từ vị trí nucleotide 315 - 627 gen CP CMV), nhằm mục đích kháng được hai virus TMV và CMV cùng lúc. Kết quả đánh giá tính kháng bệnh của các dòng cây này ở thể hệ T0 đối với cả hai virus thu được tỷ lệ kháng tương đối cao (70,8%) so với các dòng thuốc lá chuyển gen đơn đoạn, đã chứng tỏ thí nghiệm khá thành công.

Bảng 1. Kết quả biến nạp cấu trúc RNAi T-CMV-CPI vào mảnh lá thuốc lá.

Cấu trúc RNAi	Số mảnh lá đặt	Số mảnh lá sống sót/GM+ Kan 30 mg/l	Số cụm chồi sống sót /GM+ Kan 50 mg/l	Số cây sống/RM + Kan 50 mg/l	Số cây ra bầu trấu:cát	Số cây ra bầu đất trồng tại nhà lưới
T-CMV-CPI	30	22	43	105	50	48
WT1	30	0	-	-	-	-
WT2	30	30	55	114	10	10

Ghi chú: WT1 là thuốc lá không chuyển gen chuyển lên môi trường tái sinh có kháng sinh; WT2 là thuốc lá không chuyển gen chuyển lên môi trường tái sinh không có kháng sinh.

Bảng 2. Kết quả lây nhiễm nhân tạo virus các dòng thuốc lá chuyển gen T0 và WT2.

Lần lây nhiễm	Các dòng cây chuyển gen				WT2			
	Số cây được lây nhiễm	Số cây kháng hoàn toàn	Số cây có biểu hiện bệnh	Tỷ lệ kháng (%)	Tổng số cây lây nhiễm	Số cây không biểu hiện bệnh	Số cây có biểu hiện bệnh	Tỷ lệ kháng (%)
1	48	39	9 (++)	83,8	10	4	6 (+++)	40
2	39	39	0 (+)	100	4	0	4 (+++)	0
3	39	34	5 (+)	87,2	0	0		
Tổng	48	34	14	70,8	10	0	10	0

Ghi chú: (+)(++) (+++) mức độ biểu hiện bệnh nhẹ, trung bình và nặng.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra ELISA ở OD 405 nm sau 12 h các dòng thuốc lá chuyển gen T0 và WT2 sau khi lây nhiễm TMV và CMV.

S T T	Mẫu	CMV		TMV		S T T	Mẫu	CMV		TMV	
		OD	Kết luận	OD	Kết luận			OD	Kết luận	OD	Kết luận
	T-CMV 1	0,098	-	0,110	-	17	T-CMV 42	0,094	-	0,109	-
2	T-CMV 2	0,095	-	0,111	-	18	T-CMV 44	0,091	-	0,098	-
3	T-CMV 6	0,080	-	0,109	-	19	T-CMV 46	0,091	-	0,112	-
4	T-CMV 10	0,095	-	0,121	-	20	T-CMV 49	0,092	-	0,117	-
5	T-CMV 11	0,093	-	0,107	-	21	T-CMV 50	0,095	-	0,110	-
6	T-CMV 12	0,094	-	0,079	-	22	T-CMV 51	0,088	-	0,107	-
7	T-CMV 16	0,093	-	0,115	-	23	T-CMV 52	0,098	-	0,104	-
8	T-CMV 17	0,103	-	0,119	-	24	T-CMV 53	0,093	-	0,106	-
9	T-CMV 23	0,096	-	0,124	-	25	WT2-1	0,487	+	1,242	+
10	T-CMV 30	0,089	-	0,068	-	26	WT2-2	0,097	-	1,881	+
11	T-CMV 31	0,094	-	0,117	-	27	WT2-3	0,214	+	2,121	+
12	T-CMV 35	0,090	-	0,105	-	28	WT2-4	0,094	-	1,225	+
13	T-CMV 36	0,094	-	0,103	-	29	WT2-13	0,095	-	0,487	+
14	T-CMV 38	0,094	-	0,107	-	30	Đ/c dương	0,253	+	1,157	+
15	T-CMV 40	0,091	-	0,107	-	31	TB đ/c âm	0,091	-	0,098	-
16	T-CMV 41	0,097	-	0,108	-	32	2x TB đ/c âm	0,183	-	0,196	-

Ghi chú: TB đ/c âm. Trung bình giá trị OD của 4 mẫu đối chứng âm (cây khỏe không nhiễm TMV và CMV); Các mẫu được phản ứng dương là mẫu có giá trị OD (optical density = mật độ quang) > 2 lần giá trị trung bình của đối chứng âm; (-). Âm tính, không có virus; (+). Dương tính, có mặt virus trên cây.

KẾT LUẬN

Bằng việc sử dụng công nghệ RNAi, chúng tôi đã thành công trong việc tạo ra các dòng thuốc lá mang cấu trúc RNAi của gen mã hóa protein vỏ của cùng hai loại virus TMV và CMV. Tính kháng hoàn toàn hai virus cùng lúc của các dòng cây này đã được đánh giá bằng lây nhiễm nhân tạo virus, PCR, RT-PCR và ELISA.

Thành công này đã mở ra triển vọng to lớn trong việc ứng dụng phương pháp, cũng như kết quả nghiên cứu này cho những cây trồng có giá trị khác đang chịu thiệt hại bởi virus TMV và CMV.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RNAi trong tạo giống cây trồng chuyển gen kháng bệnh virus" năm 2007 - 2008. Một phần nghiên cứu được thực hiện trên các trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ

sinh học. Trung tâm bệnh cây nhiệt đới, đại học Nông nghiệp Hà Nội đã hỗ trợ các tác giả thực hiện phân tích ELISA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhary MK, Anfoka GH, Nakhla MK, Maxwell DP (2006) Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the Tomato yellow leaf curl virus complex. *Arch Virol* 151: 2349-2363.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 295-296
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA (2001) The multifunctional capsid proteins of plant RNA virus. *Annu Rev Phytopathol* 39: 419-460.
- Chen Y K, Lohuis D, Goldbach R, Prins M (2004) High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. *Mol Breed* 14: 215-226.

- Falk BW and Hull R (2004) Plant RNA Virus disease. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*: 1023-1025.
- Hamilton JH, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hammond J, Hsu HT, Huang Q, Jordan R, Kamo K, Pooler M (2006) Transgenic approaches to disease resistance in ornamental crops. *J Crop Improv* 17: 155-210.
- Herbers K, Meuwly P, Wolf B, Metraux JP, Sonnewald U (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8: 793-803.
- Herr AJ (2005) Pathways through the small RNA world of plants. *FEBS Lett* 579: 5879-5888.
- Kawakami S, Watanabe Y, Beachy RN (2004). Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6291-6296.
- Lê Trần Bình (2006) Báo cáo tổng kết đề tài "Thu thập và phân lập gen virus gây bệnh ở ba cây trồng thuộc họ Cà (*Solanaceae*) thuốc lá, khoai tây và cà chua nhằm xây dựng phương pháp chẩn đoán bệnh virus và tạo vật liệu di truyền cho tạo giống cây kháng bệnh virus". Đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2005 - 2006.
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349.
- Mowat WP, Dawson S (1987) Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *J Virol Meth* 15: 233-247.
- Nguyễn Văn Chín, Nguyễn Ngọc Bích (2008) Theo dõi tình hình sâu bệnh hại thuốc lá làm cơ sở dự báo và nghiên cứu biện pháp phòng trừ phục vụ sản xuất thuốc lá nguyên liệu. Báo cáo khoa học. Tổng công ty thuốc lá Việt Nam, Viện kinh tế kỹ thuật thuốc lá.
- Phạm Thị Vân, Nguyễn Văn Bắc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2008) Tạo cây thuốc lá kháng bệnh virus khảm dưa chuột bằng kỹ thuật RNAi. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 679-687.
- Shew, Lucas (1991) *Compendium of Tobacco Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
- Sonoda S, Mori M, Nishiguchi M (1999) Homology-Dependent Virus Resistance in Transgenic Plants with the Coat Protein Gene of *Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus*: Target Specificity and Transgene Methylation. *Phytopathology* 89: 385-391.
- Topping JF (1998) Tobacco transformation. In Foster GD, Taylor SC (ed.), *Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance*, vol. 81. Humana Press, Totowa, NJ: 365-485.
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959-13964
- Yan PQ, Bai XQ, Wan XQ, Guo ZK, Li LJ, Gong HY, Chu CC (2007) Expression of TMV coat protein gene RNAi in transgenic tobacco plants confer immunity to tobacco mosaic virus infection. *Yi Chuan* 29(8): 1018-1022.

TRANSGENIC *NICOTIANA TABACUM* PLANTS CARRING RNAi CONSTRUCT RESISTANT TO TWO MOSAIC VIRUSES

Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV) is one of the most important viral pathogens capable of affecting to many plant species, such as tomato, potato, tobacco, peppe *etc.* In order to generate transgenic tobacco plants resistant to both TMV and CMV, RNA interference (RNAi) technology has been applied in this study. A multi-fragment of 625 bp - CPi (including 305 bp from nucleotide 159 - 463 of TMV *cp* gene and 313 bp from nucleotide 315 - 627 of CMV *cp* gene) was used to construct a expression vector containing T-CMV-CP RNAi in order to silence the CP gene of both TMV and CMV. This construct was transformed into tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, cv. K326) via *Agrobacterium tumefaciens*. The PCR,

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; Fax: 84-4-38363144; E-mail: binh@ibt.ac.vn

RT-PCR and ELISA analyses indicated that the CPi multi-fragment was stably integrated in tobacco genome and resulted in the absence of TMV and CMV in the inoculated transgenic lines. The resistant evaluation of T0 transgenic tobacco plants after three times challenge with TMV and CMV revealed that 34/48 (70.8%) transgenic lines were completely resistant to both studied viruses.

Keywords: *Cucumber mosaic virus, Nicotiana tabacum, RNAi, Tobacco mosaic virus, transgenic plant*