

BÀI TỔNG QUAN

PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ VÀ NÂNG CAO TÍNH KHÁNG BỆNH VIRUS Ở THỰC VẬT

Đỗ Tiến Phát^{1,2,✉}, Phạm Bích Ngọc^{1,2}, Chu Hoàng Hà^{1,2}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: dtphat@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.10.2020

Ngày nhận đăng: 09.7.2021

TÓM TẮT

Virus là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm nhất đối với cây trồng. Sự xâm nhiễm và lây lan của virus trong cây thường gây ra những thiệt hại đáng kể về năng suất và chất lượng nông sản. Do tính chất nguy hiểm của bệnh virus gây ra với cây trồng và nền sản xuất nông nghiệp, rất nhiều biện pháp, công nghệ đã được xây dựng và phát triển phục vụ công tác quản lý, phòng trừ và nâng cao tính kháng bệnh virus ở thực vật. Phục tráng, tạo cây giống sạch virus thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kết hợp với xử lý nhiệt, lạnh hay hóa chất đã cho thấy hiệu quả tốt và được ứng dụng rộng rãi. Ngoài ra, việc sử dụng tính kháng chéo hay quy tụ gen kháng cho thấy tính ưu việt trong nâng cao phổ kháng và tính kháng bền vững với bệnh virus. Đặc biệt, việc sử dụng các công nghệ mới như chuyển gen, bất hoạt gen, chỉnh sửa gen đã tạo được những bước tiến vượt bậc trong nghiên cứu nâng cao tính kháng bệnh virus trên cây trồng. Trong khuôn khổ bài tổng quan này, chúng tôi giới thiệu tóm lược về nguyên lý hoạt động, tính ứng dụng cũng như ưu nhược điểm của một số phương pháp truyền thống và công nghệ mới trong nghiên cứu chọn tạo cây trồng kháng bệnh virus. Thêm vào đó, triển vọng và thách thức đặt ra với việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học hiện đại trong nghiên cứu tính kháng virus ở thực vật cũng được thảo luận trong bài báo này.

Từ khóa: Virus thực vật, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, chuyển gen, bất hoạt gen, chỉnh sửa gen

MỞ ĐẦU

Mặc dù có kích thước rất nhỏ và không thể quan sát dưới kính hiển vi thông thường nhưng virus là bệnh hại phổ biến và gây thiệt hại to lớn trong sản xuất nông nghiệp. Virus gây bệnh trên thực vật có sự đa dạng lớn về kích thước, thành phần sinh hóa, cấu trúc cũng như độ lớn của hệ gen (Nopsa *et al.*, 2014). Bệnh virus có thể lan truyền thông qua các phương thức khác nhau bao gồm sử dụng vector trung gian (côn trùng, nấm, tuyến trùng, thực vật ký sinh), nhân giống sinh dưỡng, hạt giống, hạt phấn, vết thương cơ giới hay thông qua tiếp xúc trực tiếp. Sau khi xâm nhập vào tế bào chủ, hệ gen virus được giải phóng khỏi lớp vỏ protein (decapsidation) và thực hiện quá trình lây nhiễm thông qua việc dịch mã và tái bản hệ gen, bao gói các thể virus mới và xâm lấn các cơ quan của thể chủ (Nicaise, 2014). Hầu hết các loại virus gây thiệt hại cho cây trồng là dạng cấp tính, tức là chúng xâm nhiễm vào cây và gây hại ở mức độ cao trong một khoảng thời gian rất ngắn. Tuy nhiên,

đối với thực vật hoang dại bệnh virus có thể tồn tại duy trì, biểu hiện chậm hơn và cũng tồn tại lâu dài với tế bào chủ (Roossinck, 2012). Sự xâm nhiễm và lây lan của virus với cây trồng thường gây ra những thiệt hại đáng kể về năng suất và chất lượng nông sản. Theo thống kê của Ủy ban Quốc tế về Phân loại Virus (The International Committee for the Taxonomy of Viruses), hiện nay đã có trên 6.500 loài virus được phát hiện, trong đó có khoảng trên 1.516 loài là virus thực vật (King *et al.*, 2011). Việc phát hiện và điều trị các bệnh virus thực vật thường khó khăn và hiệu quả không cao (Jones, Barbetti, 2012; Nopsa *et al.*, 2014). Theo ước tính, hàng năm thiệt hại do bệnh virus gây ra với sản xuất nông nghiệp trên thế giới lên đến trên 30 tỷ đô la Mỹ (Sastry, Zitter, 2014).

Do tính chất nguy hiểm của bệnh virus gây ra với cây trồng và nền sản xuất nông nghiệp, rất nhiều biện pháp, công nghệ đã được xây dựng và phát triển phục vụ công tác quản lý, phòng trừ và nâng cao tính

kháng bệnh virus ở thực vật. Trong đó, các phương pháp truyền thống đã được phát triển và ứng dụng từ rất lâu như nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, xử lý hóa chất, xử lý lạnh, xử lý nhiệt... (Lassois *et al.*, 2012). Các biện pháp này giúp loại trừ các mầm bệnh virus và tạo nguồn nguyên liệu sạch bệnh phục vụ công tác nhân giống và ứng dụng sản xuất. Bên cạnh đó, các biện pháp sử dụng tính kháng chéo (Gal-On, Shibolet, 2006) hay việc quy tụ các gen kháng (Ratcliff *et al.*, 1999) cũng mang lại những thành công đáng kể trong việc mở rộng và nâng cao tính kháng virus ở cây trồng. Gần đây, với các thành tựu của công nghệ sinh học, các công nghệ mới đã được phát triển và tạo ra những bước tiến vượt bậc trong công tác chọn tạo giống cây trồng kháng lại bệnh virus. Kỹ thuật chuyển gen đã phá vỡ rào cản trong việc trao đổi vật chất di truyền giữa các loài với nhau, tạo điều kiện để quy tụ những gen quan trọng từ nhiều loài vào trong một đối tượng sinh vật nhất định, tạo ra sự thay đổi to lớn về các tính trạng mong muốn. Việc áp dụng các kỹ thuật di truyền và phương pháp chuyển gen thực vật đã nâng cao tính kháng bệnh virus ở một số loài cây trồng (Praveen *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, sự ra đời và phát triển của công nghệ RNAi (RNA interference) đã mang lại thành công vượt bậc trong nghiên cứu nâng cao tính kháng bệnh virus trên thực vật (Ding, 2010; Duan *et al.*, 2012). Gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen đã được phát triển và ứng dụng trong chọn tạo giống cây trồng kháng lại virus và đã ghi nhận những thành tựu đáng kể (Mahas, Mahfouz, 2018; Yin, Qiu, 2019).

Trong bài tổng quan này, chúng tôi giới thiệu tóm tắt các kỹ thuật, công nghệ đã và đang được phát triển và ứng dụng trong công tác tạo cây sạch virus và nâng cao tính kháng virus ở thực vật. Nguyên lý và cách thức áp dụng của mỗi phương thức được tổng hợp trên cơ sở phân tích ưu nhược điểm của từng phương pháp. Chúng tôi cũng thảo luận về xu hướng phát triển của các công nghệ mới cũng như tiềm năng và thách thức với các công nghệ này trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng kháng lại bệnh virus trong tương lai.

PHƯƠNG PHÁP TRUYỀN THỐNG

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Meristem-tip culture)

Ở thực vật, đỉnh sinh trưởng (meristem) là loại mô nằm ở chóp rễ, đầu cành hoặc đỉnh thân. Nhóm mô này bao gồm các tế bào chưa biệt hóa (undifferentiated cells) hoặc biệt hóa chưa hoàn toàn còn gọi là tế bào phân sinh (meristematic Cell s),

được xem như là tế bào gốc (stem cells) với khả năng phân chia nhanh chóng và biệt hóa thành các loại mô, cơ quan của thực vật (Beauzamy *et al.*, 2015). Do tính chất chưa biệt hóa và khả năng phân chia nhanh, các tế bào đỉnh sinh trưởng thường tránh được sự lây nhiễm của các mầm bệnh như nấm, vi khuẩn và virus. Lợi dụng đặc điểm này, phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng đã được áp dụng để tạo cây sạch virus của nhiều loại thực vật khác nhau và được xem là cách thức hiệu quả nhất nhằm loại trừ các loại virus lan truyền thông qua hệ thống mạch dẫn (phloem) (Lassois *et al.*, 2012). Phương pháp này được thực hiện thông qua việc tách các mô ở đỉnh sinh trưởng trên cây mẹ và sử dụng làm nguyên liệu cho các bước nuôi cấy *in vitro* để tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Thêm vào đó, các bước kiểm tra được tiến hành trong quá trình tái sinh và nhân nhanh để đảm bảo độ sạch và khả năng loại trừ virus từ các mẫu cây thu được (Lassois *et al.*, 2012). Ưu điểm của phương pháp này là việc sử dụng các mẫu nuôi cấy là mô nhỏ có tốc độ phân chia nhanh được tách trong điều kiện vô trùng giúp giảm thiểu việc tạp nhiễm vi sinh vật gây bệnh từ cây mẹ.

Phương pháp xử lý hóa chất (Chemotherapy)

Các hợp chất có hoạt tính kháng virus cũng được sử dụng khá hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh virus ở thực vật. Các chất hóa học như ribavirin (RBV) (virazole), azidothymidine, 2-thiouracil (Matthews, 1953) và một số chất ức chế như inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), S-adenosylhomocysteine hydrolase và neuraminidase (NA) (Panattoni *et al.*, 2013) thường được sử dụng nhằm chống lại các bệnh do virus gây ra. Các loại hợp chất và thuốc này xâm nhập vào cây trong quá trình ngâm ủ và ngăn chặn sự nhân lên của virus (Lal *et al.*, 2015). Đến nay, phương pháp xử lý hóa chất cho thấy thành công trong việc loại trừ bệnh virus trên nhiều đối tượng.

Phương pháp xử lý lạnh (Cryotherapy)

Ở thực vật, các mầm bệnh như virus, phytoplasma và vi khuẩn có thể được loại trừ bằng xử lý nhiệt độ thấp (-196°C) trong khoảng thời gian kéo dài. Nhiệt độ lạnh sâu sẽ ức chế phản ứng trao đổi chất và phá hủy cấu trúc của mầm bệnh. Phương pháp xử lý lạnh đã được ứng dụng để loại bỏ các thể virus nhằm tạo ra cây sạch bệnh. Hiệu quả đạt được thông qua xử lý lạnh trong một số trường hợp có thể cao hơn khi so sánh với phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Lal *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015). Ưu điểm của phương pháp xử lý lạnh là có thể thực hiện

được với một số lượng lớn cây con và không bị phụ thuộc nhiều vào kích thước mẫu. Tuy nhiên, hạn chế chính của phương pháp này là chi phí lớn do việc phải sử dụng một lượng lớn khí làm lạnh cấp như Argon và Nitơ.

Phương pháp xử lý nhiệt (Thermotherapy)

Việc xử lý nhiệt được thực hiện trong một khoảng thời gian nhất định nhằm tiêu diệt nguồn bệnh mà ít làm ảnh hưởng đến sức sống của mẫu được xử lý. Nguồn nhiệt được áp dụng chủ yếu từ nước nóng, khí nóng hay hơi nước (Grondeau *et al.*, 1994). Các nghiên cứu cho thấy việc tăng nhiệt độ làm giảm và gián đoạn quá trình tổng hợp, sao chép vật chất di truyền của virus (ssRNA, dsRNA...) dẫn tới giảm đáng kể phát triển của bệnh liên quan đến virus (Lal *et al.*, 2015). Nghiên cứu trước đây cũng cho thấy phương pháp xử lý nhiệt có hiệu quả hơn khi kết hợp với các phương pháp khác. Việc kết hợp giữa xử lý nhiệt và hóa chất giúp nâng cao hiệu quả trong loại trừ các bệnh virus như khảm lá (Arabis mosaic virus), virus đốm trắng hoại tử chi mơ mạn (Prunus necrotic ringspot virus) với hiệu quả cao (Modarresi Chahardehi *et al.*, 2016).

Sử dụng tính kháng chéo (Cross protection)

Khả năng xâm nhiễm của một loại virus bị ngăn cản bởi sự lây nhiễm trước đó (lây nhiễm khởi nguyên) của một loại virus tương tự hoặc một dòng phân lập khác của cùng loại virus gây bệnh. Cơ chế này được công bố lần đầu tiên vào năm 1929 với virus khảm thuốc lá (Tobacco mosaic virus - TMV). Bảo vệ chéo là một quá trình tự nhiên trong đó tính kháng của thực vật với một chủng virus được tạo ra bởi sự lây nhiễm hệ thống với loại virus thứ hai (Gal-On and Shibolet, 2006). Cây chuyển gen biểu hiện TMV-CP là ví dụ điển hình cho cơ chế bảo vệ chéo thông qua CP, thể hiện được tính kháng tốt với TMV. Tính kháng chéo cũng được ứng dụng thành công trong kiểm soát các bệnh virus như: virus X trên khoai tây (PVX), virus xoắn lá khoai tây (PLRV) cũng như các virus có hệ gen DNA và RNA (Gal-On, Shibolet, 2006; Pennazio *et al.*, 2001).

Quy tụ gen (Gene Pyramiding)

Quy tụ gen liên quan đến việc tạo ra tính kháng bền vững thông qua việc tổ hợp nhiều gen, dẫn đến sự biểu hiện đồng thời của các gen kháng khác nhau. Kỹ thuật này có ý nghĩa quan trọng bởi vì nó nâng cao hiệu quả chọn giống, hướng tới việc tạo ra nguồn gen và phát triển tính kháng phổ rộng với bệnh virus. Thành công của phương pháp quy tụ gen dựa trên

các yếu tố quan trọng như: số gen được quy tụ, số lượng kiểu gen được chọn lọc trong mỗi thế hệ, khoảng cách giữa các gen mục tiêu và các chỉ thị phân tử cũng như đặc tính tự nhiên của vật liệu chọn lọc. Các công cụ tiên tiến như microarray, chip DNA và SNPs giúp nâng cao hiệu quả đánh giá các chức năng của gen thông qua các kỹ thuật thực nghiệm phân tích hệ gen. Quy tụ gen có thể tạo tính kháng cao đối với các stresses sinh học và phi sinh học ở cây trồng. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này đó là tốn nhiều thời gian và chi phí trong việc phát triển những dòng gen cần quy tụ. Bên cạnh đó hiệu quả quy tụ còn chịu ảnh hưởng của hiệu ứng tương tác gen (Joshi, Nayak, 2010).

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CHỌN TẠO GIỐNG KHÁNG BỆNH VIRUS

Tăng cường tính kháng virus thông qua chuyển gen (Genetic transformation)

Thiệt hại về năng suất và chất lượng cây trồng do virus gây ra là rất nặng nề. Tuy nhiên, các biện pháp kiểm soát cho đến nay đều không đầy đủ và chi phí cao. Việc áp dụng các kỹ thuật di truyền và phương pháp chuyển gen thực vật đã nâng cao tính kháng bệnh virus ở một số loài cây trồng (Sah *et al.*, 2014). Kỹ thuật chuyển gen đã được áp dụng trên các loài cây như cà chua, khoai tây, lúa, cây họ đậu, bầu bí... là những loài cây bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi nhiễm virus (Praveen *et al.*, 2017). Các nghiên cứu về cây trồng chuyển gen dựa vào biến nạp gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* hay các phương pháp chuyển gen trực tiếp thông qua xung điện (electrical), hóa chất (chemical) hoặc tác nhân vật lý (physical). Các gen tiềm năng đã được chuyển thành công vào cây trồng và cho thấy sự tăng cường các tính kháng bệnh ngay ở thế hệ đầu tiên. Gần đây, phương pháp chuyển gen thể hiện tính hiệu quả trong việc cải tiến giống cây trồng thông qua việc đưa vào các gen cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng, cho sự trao đổi chất, chống chịu stress và kiểm soát mầm bệnh (Tsaftaris *et al.*, 2000). Trong đó, kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất là chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Đây là một phương pháp đơn giản, hiệu quả cao và giảm thiểu những yêu cầu đặc biệt về hệ thống nuôi cấy cũng như tính đặc hiệu của tế bào chủ (Christou, 1995). Tuy nhiên, khả năng tái sinh chuyển gen thông qua *Agrobacterium* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: kiểu gen thực vật, chủng vi khuẩn, điều kiện ngoại cảnh trong quá trình tiền nuôi cấy và đồng nuôi cấy... Kỹ thuật chuyển gen trực tiếp

(xung điện, súng bắn gen...) ít chịu ảnh hưởng bởi yếu tố loài, những trở ngại về nuôi cấy mô hay kiểu gen thực vật. Tuy nhiên, hiệu quả của các phương pháp này bị ảnh hưởng bởi những thay đổi trong tế bào đích. Hơn nữa, ở hầu hết các trường hợp, khả năng phát triển của cây chuyển gen phụ thuộc lớn vào khả năng tái sinh của tế bào nhận gen.

Thành công của phương pháp chuyển gen trong tạo tính kháng bệnh virus đã được khẳng định trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau ví dụ việc biểu hiện một phần gen mã hóa cho yếu tố liên quan tới quá trình tái bản của virus đã nâng cao tính kháng virus sọc lá (Maize streak virus) trên cây ngô (Kreuze, Valkonen, 2017). Ngoài ra, cây chuyển gen kháng lại bệnh virus được công bố trên các cây trồng khác như thuốc lá, khoai tây, lúa và đu đủ... giúp bảo vệ sản xuất và nâng cao lợi ích kinh tế (Rani, Usha, 2013). Tuy nhiên, hiện này vẫn còn tồn tại những quan ngại liên quan đến tác động môi trường, đa dạng sinh học, tính an toàn... của cây trồng biến đổi gen mặc dù chưa có những bằng chứng cụ thể nào.

Tạo tính kháng virus thông qua công nghệ RNAi (RNA interference)

*** Cơ chế hoạt động của RNAi ở thực vật**

RNAi là cơ chế ức chế sự biểu hiện vật chất di truyền ở giai đoạn RNA. Ở thực vật có ba con đường ức chế RNA. Con đường đầu tiên là sự ức chế gen sau phiên mã (post-transcriptional gene silencing, PTGS) qua trung gian là siRNA (short interfering RNA). Con đường thứ hai gồm có các miRNA (micro-RNA). Con đường thứ ba là ức chế gen phiên mã (transcriptional gene silencing - TGS) bằng cách liên kết với quá trình biến đổi nhiễm sắc thể trực tiếp qua siRNA, nó bao gồm sự methyl hóa histone và DNA. Vai trò sinh học khác nhau của các con đường này đã được chứng minh, bao gồm kháng virus, điều khiển biểu hiện gen và sự ngưng tụ chất nhiễm sắc thành thể dị nhiễm sắc (Baulcombe, 2004).

Các phân tử quan trọng tham gia vào cơ chế RNAi này là hai enzym Dicer và Argonaute (AGO) trong phức hệ RISC (RNA-induced silencing complex) và những RNA ức chế nhỏ (short interfering RNA, siRNA) hay miRNA.

Sự ức chế RNA thông qua siRNA: xảy ra ở tế bào thực vật và là con đường quan trọng trong tế bào thực vật nhiễm virus nơi mà double strain RNA (dsRNA) có thể sao chép gián tiếp hoặc một phần cấu trúc thứ cấp của RNA virus sợi đơn. Trong trường hợp là virus DNA thực vật, dsRNA có thể được tạo ra nhờ

quá trình phiên mã bổ sung gói nhau (Baulcombe, 2004; Hamilton, Baulcombe, 1999). Cơ chế cũng xảy ra tương tự như ở động vật. Khi có sự xâm nhập của RNA sợi kép vào tế bào chất, Dicer (một thành viên trong họ RNaseIII) - một loại ribonucleases đặc hiệu cho dsRNA sử dụng năng lượng từ một phân tử ATP lập tức cắt những RNA sợi kép này thành những đoạn ngắn hơn, khoảng 21-25 nucleotid, gọi là siRNA (Bernstein *et al.*, 2001). Khi lai những RNA đã cho thấy đó là những sợi đôi có chứa nhóm phosphat ở đầu 5'. Sau khi bị cắt ngắn bởi Dicer, chuỗi kép siRNA được tách ra làm thành hai sợi đơn, và chỉ sợi đơn RNA với đầu 5' có lực bắt cặp base (base-pairing) nhỏ nhất được chọn để tiếp tục liên kết với Argonaute. Quá trình lựa chọn chuỗi đơn RNA này xảy ra trong phức hệ RISC, trong đó có chứa Argonaute và Helicase (Schwarz *et al.*, 2002). Phân tử ATP phân tách siRNA sợi đôi để tạo thuận lợi cho RISC hoạt động, phức hệ RISC sau đó nhận biết các phân tử phiên mã mRNA của tế bào có trình tự tương đồng với trình tự của đoạn chuỗi đơn siRNA lúc này đang có mặt trong phức hệ RISC (Song *et al.*, 2004). Sau khi nhận dạng mRNA qua việc bắt cặp các base tương đồng với trình tự của chuỗi đơn siRNA, mRNA bị cắt đứt ở khoảng giữa của chuỗi kép siRNA-mRNA thành những đoạn nhỏ khoảng 12 nucleotid từ đầu 3'. Sau khi bị cắt đứt, mRNA nhanh chóng bị tiêu hủy bởi các RNA nuclease.

Sự ức chế RNA thông qua miRNA: Ngay sau khi phát hiện ra cơ chế RNAi, người ta nhanh chóng nhận ra rằng, cơ chế này đã được sử dụng từ lâu trong tế bào bởi một hệ thống điều hòa biểu hiện gen gọi là micro-RNA (miRNA). MiRNA là một loại RNA nhỏ dài 21-24 nucleotide không mã hóa có chức năng chủ yếu là điều khiển âm sau phiên mã vì cặp base có trình tự bổ sung gần như hoàn toàn với mRNA đích (Bartel, 2004). Cơ chế miRNA có nhiều điểm tương đồng với cơ chế siRNA. Trong tế bào động vật, khi những phân tử miRNA tiền thân (gọi là pre-miRNAs) được tạo ra trong nhân qua quá trình phiên mã từ gen, pre-miRNAs được cắt gọt bởi một enzyme có mặt trong nhân gọi là Drosha để tạo thành những sợi pre-miRNAs. Các pre-miRNAs sau đó được di chuyển ra ngoài tế bào chất và tương tác với enzyme Dicer rồi kế tiếp là phức hệ RISC như trình bày ở trên. Còn ở thực vật, miRNA được tiến hành nhờ Dicer và phần lớn chỉ xảy ra ở nhân, và có một protein liên kết dsRNA đặc hiệu là HYL1. miRNA động vật thường liên kết với vùng 3' không dịch mã (untranslated region, UTR) của mRNA, trong khi miRNA thực vật có gắn kết với trình tự mã

hóa và thậm chí vùng 5' UTR của mRNA (Sunkar, Zhu, 2004). Một điều đáng chú ý là, ở thực vật miRNA ức chế biểu hiện mRNA chủ yếu qua sự tiêu hủy mRNA, trong khi đó ở động vật miRNA can thiệp chủ yếu bằng cách ức chế quá trình dịch mã của mRNA (Rhoades *et al.*, 2002). Độ tương đồng trong trình tự của miRNA với mRNA trong phức hệ RISC sẽ quyết định mRNA sẽ bị cắt và tiêu hủy làm bất hoạt quá trình dịch mã của mRNA. Nếu trình tự của miRNA giống hệt với trình tự của mRNA, mRNA bị tiêu hủy. Nếu trình tự của miRNA tính từ đầu 5' chỉ cần tối thiểu tương đồng với mRNA từ nucleotide vị trí số 2 đến số 8 thì cơ chế miRNA sẽ kích hoạt, tức là chỉ chặn đứng sự dịch mã mà không làm tiêu hủy mRNA (Denli *et al.*, 2004).

Con đường bất hoạt gen thứ ba ở thực vật có liên quan tới sự methyl hoá DNA và sự ức chế phiên mã. Bằng chứng đầu tiên cho dạng bất hoạt gen này được khám phá trên thực vật mà gen chuyên và RNA virus có xu hướng methyl hoá DNA tạo nên trình tự nucleotid đặc hiệu (Jones *et al.*, 2001). Tiếp theo, những phát hiện này đã được mở rộng bằng việc quan sát sự methyl hoá DNA thông qua siRNA trên thực vật được liên kết với biến đổi histone và trong sự nhân đôi nấm men, sự hình thành sợi tạp sắc ở xung quanh vùng tâm động được liên kết với siRNA (Volpe *et al.*, 2002). Một vai trò quan trọng của sự bất hoạt gen ở mức độ nhiễm sắc thể là bảo vệ genome tránh những phân hủy gây ra bởi transposon (Baulcombe, 2004).

Cả ba con đường này có thể có chung nguồn gốc bởi vì đều có những ví dụ của mỗi dạng trên động vật, nấm và thực vật. Với thực vật chúng đã có khả năng chứa cả ba dạng bất hoạt gen nêu trên, trong khi những sinh vật khác có thể thiếu mất một hoặc nhiều hơn các con đường này. Ví dụ, nấm men này chòi đường như thiếu cả ba con đường và cho đến nay tất cả những ví dụ của gen tự nhiên tìm thấy ở động vật đều là miRNA (Bartel, 2004).

* Ứng dụng công nghệ RNAi trong nghiên cứu tạo cây trồng kháng bệnh virus

Ngoài vai trò điều tiết quá trình sinh trưởng và phát triển ở tế bào thực vật, công nghệ RNAi còn đồng thời hoạt động như một cơ chế kháng bệnh virus của cây trồng (Ding, 2010). Công nghệ này đã được phát triển, ứng dụng thành công trong nâng cao tính kháng với bệnh virus trên nhiều loài thực vật khác nhau. Cho đến nay, công nghệ RNAi đã được áp dụng thành công trong việc tạo tính kháng với hơn 60 chủng virus gây hại ở các loài cây trồng quan

trọng như: đốm vòng trên đu đủ (*Papaya ringspot virus - PRSV*) (Ye, Li, 2010), chùn đọt chuối (*Banana bunchy top virus - BBTV*) (Elayabalan *et al.*, 2013), (*Citrus tristeza virus - CTV*) (Soler *et al.*, 2012), bệnh trên quả mơ mạn (virus plum pox-PPV) (Hily *et al.*, 2007; Ravelonandro *et al.*, 2014), sọc lá ngô (*Maize streak virus - MSV*) (Shepherd *et al.*, 2007), khảm lùn trên cây ngô (*Maize dwarf mosaic virus - MDMV*) (Zhang *et al.*, 2013) khảm lá đậu tương (*Soybean mosaic virus - SMV*) (Gao *et al.*, 2015) và vàng xoắn lá cà chua (*Tomato yellow leaf curl virus - TYLCV*) (Fuentes *et al.*, 2006). Gần 30 loài cây trồng khác nhau đã được chuyển và biểu hiện thành công cấu trúc RNAi mang các phân đoạn RNA khác nhau nhằm nâng cao tính kháng tới nhiều chủng virus gây bệnh. Trong số đó, hàng chục loài cây kháng bệnh virus đã được thương mại hóa trên một số quốc gia và vùng lãnh thổ ví dụ như đu đủ kháng bệnh đốm vằn PRSV (Gonsalves, 2006; Ye, Li, 2010), khoai tây kháng virus xoắn lá (*Potato leafroll virus - PLRV*), virus Y (PVY), các loại bí kháng bệnh khảm dưa chuột (*Cucumber mosaic virus - CMV*) hay (*Zucchini yellow mosaic virus - ZYMV*).

Việc tạo tính kháng virus sử dụng công nghệ RNAi chủ yếu thành công thông qua phương pháp chuyển gen. Tuy nhiên, phương pháp chuyển gen gặp những trở ngại liên quan tới khả năng tái sinh, chi phí cũng như những quan ngại về cây trồng biến đổi gen. Do vậy, một số phương pháp áp dụng các dsRNA ngoại sinh (exogenous) đã được thử nghiệm thành công trong việc kích hoạt cơ chế bất hoạt gen RNAi để tạo tính kháng virus (Kaldis *et al.*, 2018; Namgial *et al.*, 2019; Worrall *et al.*, 2019). Mặc dù vậy, nhược điểm lớn của phương pháp này là tính kháng virus mang tính tạm thời và chỉ kéo dài 5 đến 7 ngày sau xử lý (Mitter *et al.*, 2017). Gần đây, một nhóm nghiên cứu đã có một cách tiếp cận mới đó là sử dụng các tấm nano (layered double hydroxide nanosheet) để đưa các dsRNA vào tế bào chủ và đã tạo thành công tính kháng CMV ở cây thuốc lá (Mitter *et al.*, 2017). Cách tiếp cận này không chỉ tăng tính ổn định của dsRNA trong cây mà còn duy trì liên tục nguồn cấp dsRNA để kéo dài thời gian kháng bệnh.

Tạo tính kháng virus bằng công nghệ ZFN hoặc TALEN

Khoảng hơn một thập kỉ trước, một phương pháp mới, được gọi là kỹ thuật chỉnh sửa gen đã xuất hiện và biến khả năng thay đổi thông tin di truyền ở trong các loại tế bào và sinh vật trở thành hiện thực. Zinc finger nucleases (ZFNs) và Transcription

activator-like effector nucleases (TALENs) là những công cụ đầu tiên cho chỉnh sửa gen (Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). Cả ZFNs và TALENs đều là protein dung hợp (chimeric protein) tạo ra bằng cách kết hợp một vùng bám gắn DNA (DNA-binding domain (DBD)) từ protein zinc finger hoặc transcription activator-like effector với vùng mang chức năng cắt không đặc hiệu (non-specific cleavage domain) của enzym *FokI*. Vùng DBD sẽ xác định trình tự nucleotide trên DNA đích và bám vào; vùng mang chức năng phân cắt (cleavage domain) sẽ cắt DNA để tạo ra các đứt gãy trên cả hai sợi DNA (double-strand break) tại vị trí định hướng (Boch *et al.*, 2009; 2009; Urnov *et al.*, 2010). Ở sinh vật nhân chuẩn, các vùng đứt gãy trên sợi đôi DNA sẽ được sửa chữa thông qua hai cơ chế: Sự ghép nối của các đầu nối không tương đồng (Non homologous end joining -NHEJ) và sửa chữa thông qua các trình tự tương đồng (Homology directed repair - HDR). Cả hai phương thức sửa chữa này đều có thể gây đột biến ở vị trí đứt gãy trên gen quan tâm (Wyman, Kanaar, 2006). Các công nghệ chỉnh sửa gen này không chỉ có khả năng tạo các dạng đột biến như mất đoạn, thêm đoạn hay thay đổi nucleotide trên vùng gen mong muốn mà còn là một phương thức để chống lại các virus gây bệnh trên thực vật.

Ngay từ năm 2005, Sera đã phát triển một protein zinc finger nhân tạo (AZP) không chứa vùng có chức năng cắt như ZFN. Protein nhân tạo này có chức năng bám vào vùng liên kết gen (intergenic region - IR) trên hệ gen của virus xoắn đột lá củ cải đường (*Beet severe curly top virus - BSCTV*) thuộc họ *Geminiviridae* (Sera, 2005). Vùng IR của các geminivirus là điểm bám của protein khởi đầu quá trình sao chép (replication initiator protein - Rep) và đóng vai trò quan trọng trong quá trình tái bản của virus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Việc biểu hiện AZP trong cây chuyển gen sẽ ngăn cản quá trình tái bản và gây hại của virus trong cây do protein này ức chế tương tác giữa protein khởi đầu tái bản và vùng IR của virus (Sera, 2005). Sử dụng cùng phương thức nêu trên, đã giảm thiểu quá trình tái bản của virus gây bệnh tungro trên cây lúa (*Rice tungro bacilliform virus - RTBV*) (Ordiz *et al.*, 2010). Khác với AZP, Công nghệ ZFN sử dụng cả vùng protein có chức năng bám gắn DNA (DBD) và vùng phân cắt DNA (cleavage domains). Hệ thống này được phát triển để phá hủy gen Rep của hai loại begomovirus bao gồm virus xoắn vàng lá cà chua Trung Quốc (*Tomato yellow leaf curl China virus - TYLCCNV*) và virus xoắn đột cây thuốc lá (*Tobacco curly shoot virus - TbCSV*) và đã ngăn cản quá trình

tái bản và nhân lên của hai loại virus này (Chen *et al.*, 2014).

Tương tự như vậy, hệ thống TALEs được phát triển từ TALEN và không mang vùng có hoạt tính nuclease (hoạt tính cắt DNA) để bám gắn vào các vùng có tính bảo tồn cao trong hệ gen của begomovirus. Cây thuốc lá chuyển gen tăng cường biểu hiện của TALEs cho thấy tính kháng tốt với virus TbCSV, TYLCCNV, đồng thời nâng cao tính chống chịu với bệnh virus xoắn lá cà chua (*Tomato leaf curl Yunnan virus -TLCYNV*) (Cheng *et al.*, 2015). Ứng dụng công nghệ TALEN trong việc tạo tính kháng virus trên thực vật chưa được ghi nhận. Tuy nhiên, hệ thống này đã được khẳng định tiềm năng trong việc chống lại một số loại virus gây bệnh trên người như virus viêm gan B (HBV), viêm gan C (HCV) và virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV) (Bloom *et al.*, 2015).

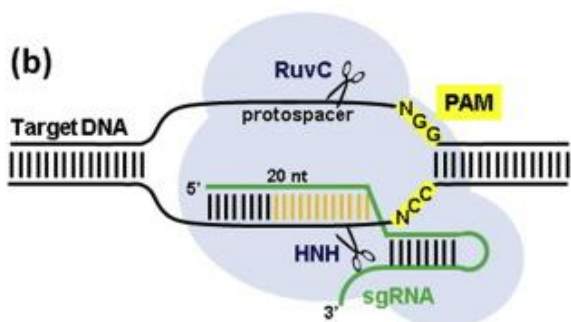
Ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas trong tạo tính kháng bệnh virus hại cây trồng

* Giới thiệu về hệ thống chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas

Công nghệ chỉnh sửa hệ gen (genome editing) đã có những bước tiến vượt bậc trong những năm gần đây với sự ra đời của hệ thống CRISPR/Cas. Được phát hiện đầu tiên vào năm 1987 trong nghiên cứu của Ishino và cộng sự về hệ gen của vi khuẩn *E.coli* (Ishino *et al.*, 1987). Hệ thống này được phát hiện trên các vi sinh vật nhân sơ khác ở các nghiên cứu tiếp theo. Chức năng của chuỗi trình tự CRISPR (CRISPR array) và Cas9 gen được nghiên cứu và làm rõ vào năm 2007 (Barrangou *et al.*, 2007). Các nghiên cứu về cơ chế hoạt động của hệ thống cũng được quan tâm và làm rõ. Bước ngoặt đột phá trong sử dụng hệ thống CRISPR/Cas được ghi nhận năm 2013 với những thành công trong việc chỉnh sửa hệ gen trên tế bào người (Cong *et al.*, 2013). Sau thành công này, hệ thống CRISPR/Cas tiếp tục được mở rộng nghiên cứu trên rất nhiều đối tượng sinh vật khác nhau bao gồm vi sinh vật, động vật, thực vật... Hệ thống này đang được xem là hệ thống chỉnh sửa hệ gen đơn giản, chính xác và hiệu quả nhất tính tới thời điểm hiện tại.

CRISPR/Cas là thành phần quan trọng trong cơ chế “đáp ứng miễn dịch” thông qua axit nucleic của tế bào vi khuẩn. Hệ thống này được phân chia thành ba nhóm chính (Type I, Type II và Type III) dựa trên sự sắp xếp của locus CRISPR và sự có mặt của các protein Cas3, Cas9 và Cas10 (Makarova *et al.*, 2011). Trong đó, nhóm II (type II) của hệ thống

CRISPR/Cas đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen. Nhóm này có chứa bốn gen mã hóa cho các protein Cas bao gồm *Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, và một trong hai loại *Csn2* hoặc *Cas4*. Trong đó, *Cas9* tham gia vào quá trình tổng hợp các CRISPR-RNA (crRNA) và quá trình phá hủy DNA ngoại lai. *Cas9* là protein có đa chức năng và có khối lượng phân tử lớn với hai vùng chức năng (RuvC-like nuclease và HNH nuclease) (Hình 1).



Hình 1. Hệ thống CRISPR/Cas9 dùng trong chỉnh sửa hệ gen. RuvC và HNH là hai tiểu đơn vị của protein Cas9 và có chức năng cắt sợi đôi DNA tại vùng định hướng cắt được xác định bởi trình tự định hướng sgRNAs (single guide RNA) và trình tự nhận biết đặc trưng cho protein Cas9 là PAM (protospacer adjacent motif). (Bortesi and Fischer, 2015)

Cơ chế hoạt động của hệ thống “đáp ứng miễn dịch” của vi khuẩn thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 bao gồm ba bước chính: Ghi nhận, biểu hiện và xúc tiến bảo vệ. Hệ thống “đáp ứng miễn dịch” được khởi động với việc DNA của virus hay vector ngoại lai bị cắt nhỏ và gắn vào các trình tự CRISPR. Tiếp theo, protein Cas được hình thành thông qua quá trình phiên mã và dịch mã của hệ gen Cas, đồng thời quá trình phiên mã của gen transactivating RNA và các trình tự CRISPR tạo ra các đơn vị RNA nhỏ còn gọi là CRISPR-RNA (crRNA) và tracrRNA. Sự kết hợp của crRNA và tracrRNA tạo ra phức hệ cấu trúc giúp xác định các phân tử DNA ngoại lai và xúc tiến quá trình phá hủy hay bất hoạt các đơn vị DNA này thông qua hoạt động của protein Cas9. Tại vị trí nhận biết trên phân tử DNA ngoại lai (trình tự định hướng), tác động của phức hợp tracrRNA-crRNA hình thành nên cấu trúc kẹp tóc (DNA hairpin structure). Protein Cas9 gắn vào phân tử DNA ngoại lai tại vị trí kẹp tóc, vùng chức năng NHN của protein Cas9 sẽ cắt sợi đơn DNA có trình tự bổ sung với crRNA, trong khi vùng chức năng RuvC có nhiệm vụ cắt sợi đơn DNA không có trình tự bổ sung với crRNA (Jinek *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2013; Wiedenheft *et al.*, 2012). Các đứt gãy đặc hiệu

trên phân tử DNA được tạo ra bởi phức hệ Cas9-tracrRNA-crRNA sẽ được sửa chữa thông qua hai cơ chế: cơ chế ghép nối của các đầu cắt không tương đồng (Nonhomologous End Joining- NHEJ) và cơ chế sửa chữa DNA với sự có mặt của trình tự DNA bổ sung (Homology Dependent Repair-HDR). Quá trình sửa chữa sẽ hình thành các thay đổi trong trình tự DNA như chèn thêm đoạn, mất đoạn... Trình tự đặc hiệu (seed sequence) 8-12 axit nucleic bên trong crRNA và trình tự 3 axit nucleic (protospacer adjacent motif -PAM) trước điểm bắt cặp bổ sung của crRNA là hai thành phần quan trọng cần thiết cho việc nhận biết các điểm cắt của phân tử protein Cas9 (Jinek *et al.*, 2012).

Bên cạnh Cas9, hàng loạt các protein Cas khác cũng đã được phát triển và ứng dụng trong nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen. Các dạng protein này có thể tạo ra các thay đổi nhỏ trên DNA như Cas-based nucleases và nicksases (Fauser *et al.*, 2014). Ngoài ra, hệ thống CRISPR/Cas cũng được phát triển nhằm tác động lên các trình tự RNA, ví dụ FnCas9, Cas13a ... (Zhang *et al.*, 2019), thay vì các đơn vị DNA như hệ thống khởi nguyên CRISPR/Cas9.

* Ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas trong nghiên cứu tạo cây trồng kháng bệnh virus

Hệ thống CRISPR/Cas gốc từ *Streptococcus pyogenes* được phát triển và ứng dụng trong nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen với tác động trực tiếp lên DNA. Do đó, trong các nghiên cứu tạo tính kháng virus ở thực vật, CRISPR/Cas9 ban đầu được sử dụng để chống lại geminivirus thông qua tác động lên DNA liên quan tới quá trình tái bản và nhân lên của các virus này trong cây (Mahas, Mahfouz, 2018; Yin and Qiu, 2019). Tuy nhiên, virus với hệ gen là RNA có độ đa dạng cao và gây ra nhiều thiệt hại cho cây trồng và sản xuất nông nghiệp hơn so với virus có hệ gen là DNA. Do vậy, các nhà nghiên cứu tiếp tục phát triển hệ thống CRISPR/Cas bằng việc sử dụng các protein Cas từ các chủng khuẩn khác nhau để có thể tác động lên các virus có hệ gen RNA. Điển hình là Cas9 từ *Francisella novicida* (FnCas9) và Cas13a từ *Leptotrichia shahii* (LshCas13a) hay *Leptotrichia wadei* (LwaCas13a) đã cho thấy khả năng tác động lên RNA trong điều kiện *in vivo* (Abudayyeh *et al.*, 2016). Những thành công này đã mở ra triển vọng trong ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas trong nâng cao tính kháng bệnh do virus có hệ gen RNA gây hại trên thực vật. Bên cạnh việc tác động trực tiếp lên hệ gen virus để tạo tính kháng, các nghiên cứu gần đây đã ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas để tác động đến các nhân tố bên

trong vật chủ có vai trò trong quá trình xâm nhiễm và tái bản của virus để tạo tính kháng cho cây trồng. Như chúng ta đã biết, để hoàn thành quá trình xâm nhiễm và lây lan, virus cần dùng tới nhiều yếu tố của cây chủ để thực hiện quá trình tái bản, phiên mã, dịch mã, ... Đặc điểm này là một lựa chọn tiềm năng cho chúng ta có thể tác động nhằm hạn chế khả năng gây bệnh của virus. Ví dụ điển hình là việc ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 nhằm tác động vào yếu tố khởi đầu dịch mã ở thực vật eIF4e/eIFiso4E (eukaryotic initiation factor 4E và isoform của nó eIFiso4E) để tạo tính kháng virus.

TRIỂN VỌNG VÀ CÁC THÁCH THỨC TRONG NGHIÊN CỨU NÂNG CAO TÍNH KHÁNG BỆNH VIRUS Ở THỰC VẬT

Việc ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại mang lại tiềm năng lớn để có thể vượt qua các hạn chế của các phương pháp truyền thống trong nâng cao tính kháng bệnh virus ở thực vật. Cụ thể, cả RNAi và công nghệ chỉnh sửa gen khi nhắm đến hệ gen virus thì có thể phát triển và áp dụng cho cả các đối tượng cây trồng với ít thông tin về trình tự bộ gen. Thêm vào đó, giống kháng virus tạo được bằng kỹ thuật RNAi hoặc công nghệ chỉnh sửa gen không yêu cầu đến việc lai tạo và chọn dòng qua nhiều thế hệ nên sẽ giảm thiểu đáng kể thời gian chọn tạo giống. Việc áp dụng dsRNA ngoại sinh để tác động vào RNA virus có thể được dùng như một phương án khẩn cấp chống lại đại dịch do virus gây ra. Ngoài ra, việc phá hủy một yếu tố quan trọng trong vật chủ liên quan đến quá trình tái bản và nhân lên của virus thông qua hệ CRISPR/Cas là một cách thức hiệu quả để tạo giống cây kháng virus. Thêm vào đó, trải qua một số thế hệ lai ngược và sàng lọc hoặc sử dụng các hệ thống tạo đột biến không thông qua chuyển gen, các giống cây trồng kháng virus và không mang gen chuyển có thể được tạo ra và thương mại dễ dàng hơn (Zhao *et al.*, 2020).

Tuy nhiên, những công nghệ mới này cũng tồn tại một số hạn chế nhất định mà chúng ta cần quan tâm và cải tiến để có được hiệu quả tốt hơn trong công tác phát triển cây trồng kháng bệnh virus. Thông qua quá trình tiến hóa lâu dài, các virus đã phát triển nhiều cách thức để chống lại cơ chế bất hoạt gen thông qua RNA (RNA silencing). Một trong số đó là nhân tố ức chế việc bất hoạt gen (viral suppressor of RNA silencing-VSR) và đây đã trở thành một vấn đề lớn đối với phương pháp tạo tính kháng virus sử dụng công nghệ RNAi (Qu, 2010; Voinnet, 2005). ZFN và TALEN dù được phát triển

từ sớm nhưng không được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu tạo tính kháng virus ở thực vật bởi chi phí cao và tính phức tạp trong thiết kế và ứng dụng của các công nghệ này. CRISPR/Cas là một hệ thống miễn dịch bắt nguồn một cách tự nhiên từ sinh vật nhân sơ nên các virus trên sinh vật nhân chuẩn chưa được tiếp xúc, tương tác với hệ thống đáp ứng miễn dịch này và ít có khả năng chống lại CRISPR/Cas. Mặc dù vậy, khi sử dụng CRISPR/Cas để tạo cây kháng virus có hệ gen DNA, virus cũng sẽ tiến hóa và sinh ra các đột biến để tránh sự phân cắt và phá hủy của hệ thống CRISPR/Cas (Ali *et al.*, 2016; Mehta *et al.*, 2019). Ngoài ra các đột biến mới trong hệ gen virus có thể hình thành qua tác động của hệ thống CRISPR/Cas. Điều này có thể gây mất tính kháng virus của cây trồng hay phát triển loại virus mới có độc tính cao hơn và gây hại mạnh hơn. Mặc dù các kỹ thuật công nghệ sinh học hiện đại vẫn tồn tại những hạn chế nhất định, tiềm năng to lớn của các công nghệ RNAi, ZFN, TALEN và CRISPR/Cas trong nghiên cứu và ứng dụng nhằm tạo tính kháng virus ở thực vật vẫn chưa được khai thác tốt. Chúng ta cần tiếp tục nghiên cứu để phát triển những phương pháp này bao gồm cải thiện về độ chính xác, tính bền vững, tính hiệu quả và độ an toàn trong mỗi ứng dụng. Để khắc phục các hạn chế của mỗi phương pháp cần có sự kết hợp nhằm nâng cao hiệu quả của các công nghệ này, ví dụ chúng ta có thể kết hợp kỹ thuật RNAi và công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas để đem lại tiềm năng lớn trong việc tạo giống cây kháng virus.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trọng trọng cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài Độc lập trẻ cấp Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số DLTE00.10/20-21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353:doi: 10.1126/Science.aaf5573
- Ali Z, Ali S, Tashkandi M, et al (2016) CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. *Sci RepSci Rep* 6:26912. doi.org/10.1038/srep26912
- Aman R, Ali Z, Butt H, et al (2018) RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome BiolGenome Biol* 19:1-9
- Ancora G, Belli-Donini ML, Cuozzo L (1981) Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid

- in vitro micropropagation. *Sci HortSci Hort*14:207–213
- Antignus Y, Vunsh R, Lachman O, et al (2004) Truncated Rep gene originated from Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Mild] confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann Appl Biol* 144:39–44
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363
- Beauzamy L, Louveaux M, Hamant O, Boudaoud A (2015) Mechanically, the shoot apical meristem of Arabidopsis behaves like a shell inflated by a pressure of about 1 MPa. *Front Plant Sci* 6:1038. doi.org/10.3389/fpls.2015.01038
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366
- Bloom K, Mussolino C, Arbuthnot P (2015) Transcription activator-like effector (TALE) nucleases and repressor TALEs for antiviral gene therapy. *Curr Stem Cell Rep* 1:1–8
- Boch J, Scholze H, Schornack S, et al (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326:1509–1512
- Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* 33:41–52. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006
- Chen W, Qian Y, Wu X, et al (2014) Inhibiting replication of begomoviruses using artificial zinc finger nucleases that target viral-conserved nucleotide motif. *Virus Genes* 48:494–501
- Cheng X, Li F, Cai J, et al (2015) Artificial TALE as a convenient protein platform for engineering broad-spectrum resistance to begomoviruses. *Viruses* 7:4772–4782
- Chinestra SC, Curvetto NR, Marinangeli PA (2015) Production of virus-free plants of Liliun spp. from bulbs obtained in vitro and ex vitro. *Sci Hort* 194:304–312
- Christou P (1995) Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica* 85:13–27
- Cong L, Ran FA, Cox D, et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121):819–23
- De Clercq E (2005) Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res* 67:56–75
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231–235
- Ding S-W (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 10:632–644
- Duan C-G, Wang C-H, Guo H-S (2012) Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* 3(1):5. doi: 10.1186/1758-907X-3-5
- Elayabalan S, Kalaiponmani K, Subramaniam S, et al (2013) Development of Agrobacterium-mediated transformation of highly valued hill banana cultivar Virupakshi (AAB) for resistance to BBTV disease. *World J Microbiol Biotechnol* 29:589–596
- Fargette D, Konate G, Fauquet C, et al (2006) Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44:235–260
- Fausser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/C as-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 79:348–359
- Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D, et al (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Biotechnology* 10:1466–1472
- Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, et al (2006) Intron–hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to Tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 15:291–304
- Gal-On A, Shibolet Y (2006) Cross-protection. In: Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer, pp 261–288
- Gan D, Zhang J, Jiang H, et al (2010) Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *RepCell* 29:1261–1268
- Gao L, Ding X, Li K, et al (2015) Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theor Appl Genet* 128:1489–1505
- Gonsalves D (2006) Transgenic papaya: development, release, impact and challenges. *Adv Virus Res* 67:317–354
- Grondeau C, Samson R, Sands DC (1994) A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Crit Rev Plant Sci* 13:57–75
- Gubareva LV (2004) Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 103:199–203
- Guo HS, Cervera MT, García JA (1998) Plum pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that

- can be stabilized after different number of plant generations. *Gene* 206:263–272
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950–952
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* Cell. *Nature* 404:293–296
- Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol* 11:777–788
- Hily J-M, Ravelonandro M, Damsteegt V, et al (2007) Plum pox virus coat protein gene Intron-hairpin-RNA (ihpRNA) constructs provide resistance to plum pox virus in *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. *J Am Soc Hortic Sci* 132:850–858
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169:5429–5433
- inek M, Chylinski K, Fonfara I, et al (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821
- Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires MetI for maintenance. *Curr Biol* 11:747–757
- Jones RA, Barbetti MJ (2012) Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *CAB Reviews* 22: doi.10.1079/PAVSNNR20127022
- Joshi RK, Nayak S (2010) Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnol Mol Biol Rev* 5:51–60
- Kaldis A, Berbati M, Melita O, et al (2018) Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Mol Plant Pathol* 19:883–895
- Kim Y-G, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *PNAS* 93:1156–1160
- King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (2011) Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier*, pp 1221–1234
- Kreuze JF, Valkonen JP (2017) Utilization of engineered resistance to viruses in crops of the developing world, with emphasis on sub-Saharan Africa. *Curr Opin Virol* 26:90–97
- Virol* 26:90–97
- Kung Y-J, You B-J, Raja JA, et al (2015) Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. *Sci Rep* 5:9804
- Lal A, Pant M, Rani A (2015) The who's who of plant viruses: A cognitive approach. *Asian J Pharm Clin Res* 8:60–68
- Lassois L, Lepoivre P, Swennen R, et al (2012) Thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. In: Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Springer, pp 419–433
- Lau SE, Mazumdar P, Hee TW, et al (2014) Crude extracts of bacterially-expressed dsRNA protect orchid plants against Cymbidium mosaic virus during transplantation from in vitro culture. *J Hortic Sci* 89:569–576
- Mahas A, Mahfouz M (2018) Engineering virus resistance via CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Virol* 32:1–8
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9:467–477
- Matthews REF (1953) Chemotherapy and plant viruses. *Microbiology* 8:277–288
- Mehta D, Stürchler A, Anjanappa RB, et al (2019) Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome Biol* 20:80
- Mette MF, Aufsatz W, Van der Winden J, et al (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO journal* 19:5194–5201
- Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, et al (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants* 3:1–10
- Modarresi Chahardehi A, Rakhshandehroo F, Mozafari J, Mousavi L (2016). *J Crop Prot* 5:497–506
- Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501–1501
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 25:135–166
- Namgial T, Kaldis A, Chakraborty S, Voloudakis A (2019) Topical application of double-stranded RNA molecules containing sequences of Tomato leaf curl virus and Cucumber mosaic virus confers protection against the cognate viruses. *PatholPlant Pathol* 108: doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101432

- Nicaise V (2014) Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Front Plant Sci* 5: doi.org/10.3389/fpls.2014.00660
- Nopsa JH, Thomas-Sharma S, Garrett KA (2014) Climate change and plant disease. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. *Elsevier*. doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00004-8
- Panattoni A, Luvisi A, Triolo E (2013) Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Span J Agric Res* 173–188
- Pennazio S, Roggero P, Conti M (2001) A history of plant virology. Cross protection. *New Microbiol* 24:99–114
- Praveen S, Ramesh SV, Mangrauthia SK (2017) Transgenic approaches to combat plant viruses occurring in India. In: A Century of Plant Virology in India. Springer, pp 783–805
- Qu F (2010) Plant viruses versus RNAi: simple pathogens reveal complex insights on plant antimicrobial defense. *Wiley Interdiscip Rev: RNA* 1:22–33
- Rani SJ, Usha R (2013) Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *J Pharm Res* 6:879–883
- Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC (1999) Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207–1215
- Ravelonandro M, Scorza R, Michel HJ, Briard P (2014) The efficiency of RNA interference for conferring stable resistance to Plum pox virus. *PCTOC* 118:347–356
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, et al (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513–520
- Robinson KE, Worrall EA, Mitter N (2014) Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. *J Plant Biochem Biotechnol* 23:231–237
- Roossinck MJ (2012) Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet* 46:359–369
- Sah SK, Kaur G, Cheema GS (2014) Genetic transformation of rice: problems, progress and prospects. *J Rice Res* 3:1 doi: 10.4172/2375-4338.1000132
- Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, et al (2013) A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* 497:254–257
- Sastry KS, Zitter TA (2014) Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. In: Plant virus and viroid diseases in the tropics. Springer, pp 149–480
- Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD (2002) Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell* 10:537–548
- Scorza R, Callahan A, Levy L, et al (2001) Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* 10:201–209
- Sera T (2005) Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc finger proteins. *J Virol* 79:2614–2619
- Shekhawat UK, Ganapathi TR, Hadapad AB (2012) Transgenic banana plants expressing small interfering RNAs targeted against viral replication initiation gene display high-level resistance to banana bunchy top virus infection. *J Gen Virol* 93:1804–1813
- Shepherd DN, Mangwende T, Martin DP, et al (2007) Inhibition of maize streak virus (MSV) replication by transient and transgenic expression of MSV replication-associated protein mutants. *J Gen Virol* 88:325–336
- Soler N, Plomer M, Fagoaga C, et al (2012) Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnol J* 10:597–608
- Song J-J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434–1437
- Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B (2013) CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem* 82:237–266
- Sunkar R, Zhu J-K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001–2019
- Taylor DC, Katavic V, Zou J, et al (2002) Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. *Mol Breed* 8:317–322.
- Tenllado F, Martínez-García B, Vargas M, Díaz-Ruiz JR (2003) Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol* 3:1–11
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Karavangeli M, et al (2000) Transgenic crops: recent developments and prospects. In: Biological Resource Management Connecting Science and Policy. Springer, pp 187–203
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11:636–646
- Vieira RL, da Silva AL, Zaffari GR, et al (2015) Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiol Plant* 37:1733

- Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6:206–220
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, et al (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833–1837
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sänger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567–576
- Wei C, Liu J, Yu Z, et al (2013) TALEN or Cas9—rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics* 40:281–289
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482:331–338
- Wittner A, Palkovics L, Balázs E (1998) Nicotiana benthamiana plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res* 53:97–103
- Worrall EA, Bravo-Cazar A, Nilon AT, et al (2019) Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. *Frontiers in plant Science* 10:265
- Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363–383
- Ye C, Li H (2010) 20 Years of *Transgenic Res* in China for resistance to Papaya ringspot virus. *Transgenic Plant J* 4:58–63
- Yin K, Qiu J-L (2019) Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B* 374:20180322
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25–33
- Zhang T, Zhao Y, Ye J, et al (2019) Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants. *Plant Biotechnol J* 17:1185
- Zhang Z-Y, Fu F-L, Gou L, et al (2010) RNA interference-based transgenic maize resistant to maize dwarf mosaic virus. *J Plant Biol* 53:297–305
- Zhang Z-Y, Wang Y-G, Shen X-J, et al (2013) RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus. *PCTOC* 113:571–578
- Zhao Y, Yang X, Zhou G, Zhang T (2020) Engineering plant virus resistance: from RNA silencing to genome editing strategies. *Plant Biotechnol J* 18: doi.org/10.1111/pbi.13278

METHODS TO MANAGE, PROTECT AND IMPROVE PLANT VIRUS RESISTANCE

Do Tien Phat^{1,2}, Pham Bich Ngoc^{1,2}, Chu Hoang Ha^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Viral diseases caused severe damage for plant growth and development. Penetration and spread of viruses in the host plants dramatically reduce crop yield and quality. Due to the critical damages of viral diseases to agricultural production, different approaches and methods have been developed and utilized to manage, protect and improve plant virus resistance. Of which, conventional methods such as meristem culture, thermotherapy, cryotherapy as well as chemotherapy have been widely used and conducted effective results. Moreover, cross protection and gene pyramiding approaches have performed the broad and stable spectrum resistance potential in different plant species. Recently, advanced methods like plant transformation, gene silencing as well as genome editing have shown great successes in plant virus resistant improvement. In this review, we will briefly introduce the principle, advantages and limitations of different methods used for plant viral diseases management and viral resistant improvements. In addition, we will also discuss the challenges and future aspects in utilizing advanced technologies for plant virus resistant enhancement and breeding.

Keywords: Genome editing, gene silencing, genetic transformation, meristem culture, plant viruses.