

CÁC NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RNAi Ở MỘT SỐ NẤM GÂY BỆNH CÂY TRỒNG

Nguyễn Bảo Quốc¹, Nguyễn Ngọc Bảo Châu²

¹Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 08.02.2015

Ngày nhận đăng: 20.3.2016

TÓM TẮT

Câm lặng gen vốn có rất nhiều thuật ngữ khác nhau nhưng cùng một cơ chế phân tử như RNAi, co-suppression, câm gen sau phiên mã (PTGS – Post transcriptional Gene Silencing), quelling, đã trở nên phổ biến trong các nghiên cứu về vai trò bản chất bên trong và các ứng dụng của nó trên nhiều đối tượng hoặc các nghiên cứu về chức năng của các gen ở mức độ bộ gen. Kể từ khi phát hiện câm lặng gen cách đây hơn hai thập kỷ, kỹ thuật này đã được chứng minh khả năng ứng dụng trong việc phát triển thuốc trong điều trị gen nhằm chữa trị nhiều bệnh trên người. Khuynh hướng này cũng nhận được sự quan tâm và chú ý trong các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp, đặc biệt là trong bảo vệ cây trồng nhằm tạo ra các giống cây trồng có khả năng chống chịu sự tấn công của các tác nhân gây bệnh hoặc chống chịu với các yếu tố bất lợi của môi trường. Bài tổng quan này không chỉ đưa ra cái nhìn tổng quát về các nghiên cứu câm lặng gen trên hệ nấm sợi hiện nay, các cơ chế phân tử của câm lặng gen trên nấm mà còn chỉ ra những khuynh hướng, triển vọng ứng dụng của kỹ thuật này trong bảo vệ thực vật nói riêng và trong nông nghiệp nói chung góp phần đảm bảo an ninh lương thực cho nhân loại.

Từ khoá: Nấm bệnh, RNAi, RNAi sau phiên mã, chức năng gen, bộ gen

TỔNG QUAN VỀ RNAi

Việc xác định chức năng của gen theo phương pháp truyền thống có thể đạt được thông qua việc sử dụng phương pháp gây đột biến có thể bằng hoá chất như EMS, MMS, DEO, DEB hoặc có thể bằng tia UV. Phương pháp này được sử dụng để tạo kiểu hình đột biến rồi từ đó xác định gen, trình tự chuỗi của gen đó và được các nhà khoa học đặt tên theo thuật ngữ tiếng Anh là “Forward Genetics”. Tuy nhiên phương pháp này lại có một số hạn chế mà một trong số đó là khó xác định kiểu hình của những gen đa chức năng. Trong những năm gần đây trình tự chuỗi trong bộ gen của các sinh vật đã và đang được xác định và điều này đã đặt một thách thức rất lớn cho các nhà khoa học trong việc tìm hiểu chức năng của hàng nghìn gen trong bộ gen. Chính vì thế nhiều phương pháp mới đã được nghiên cứu, phát triển dựa trên thông tin trình tự chuỗi trong bộ gen để xác định chức năng của các gen và cũng đã được các nhà khoa học đặt tên theo thuật ngữ tiếng Anh với ý nghĩa ngược lại của phương pháp “Forward Genetics” là “Reverse Genetics”. Kỹ thuật dùng các phân tử siRNA (small interfering RNA) hay còn gọi là RNA interference (RNAi) là một trong những phương

pháp “Reverse Genetics” có khả năng ức chế sự phiên mã của bất kỳ gen nào trong tế bào sống của sinh vật.

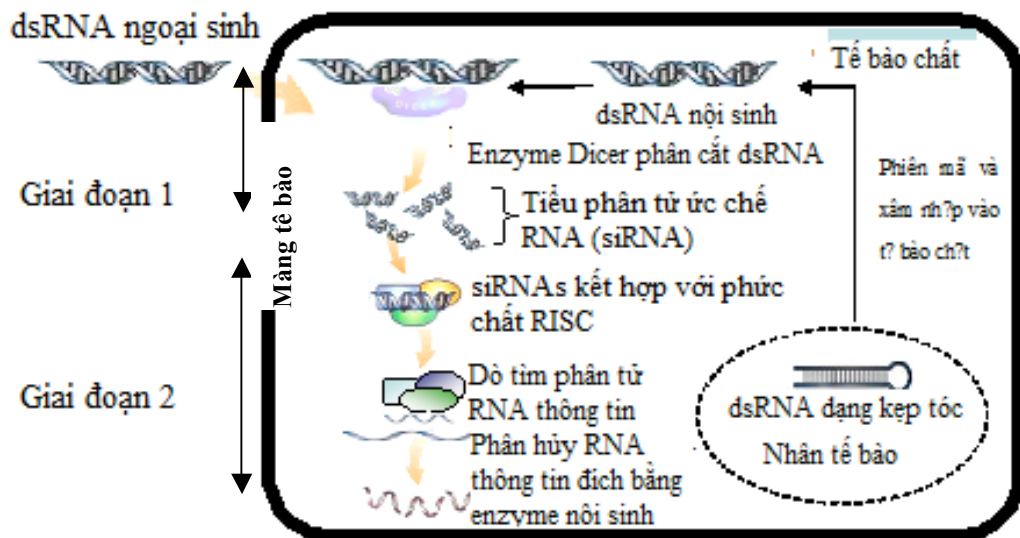
Ngày nay RNAi được xem là một trong những lĩnh vực nghiên cứu mới trong lĩnh vực sinh học. Tầm quan trọng của nó đã được minh chứng bằng giải thưởng Nobel về y học năm 2006 cho hai nhà khoa học người Mỹ có công trong việc khám phá hiện tượng này là Tiến sĩ Andrew Z. Fire ở Đại học Stanford và Tiến sĩ Craig C. Mello ở Đại học Y Khoa Massachusetts. Hướng nghiên cứu này cũng đã được tạp chí Science bình chọn là “hiện tượng khoa học trong năm 2002” dựa trên số lượng gia tăng các bài báo khoa học liên quan đến RNAi được đăng trên các tạp chí danh tiếng của quốc tế.

Hiện tượng RNAi đã được khám phá và nghiên cứu trên tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998; Ketting, Plasterk, 2000), *Trypanosoma brucei* (Ngo *et al.*, 1998), Planaria (Sanchez Alvarado, Newmark, 1999), Hydra (Lohmann *et al.*, 1999) và *Drosophila* (Misquitta, Peterson, 1999). Một số thuật ngữ khác như là đồng ức chế (co-suppression), ức chế gen sau phiên mã (post transcriptional gene silencing) được các nhà khoa học sử dụng trên đối tượng cây

trồng (Napoli, 1990; Van der Krol, 1990) và cuối cùng là thuật ngữ ức chế (quelling) được các nhà khoa học đặt tên khi nghiên cứu trên đối tượng nấm (Cogoni *et al.*, 1996). Tất cả các thuật ngữ này đều có cùng một cơ chế là câm gen và để thống nhất người ta đặt tên nó theo thuật ngữ tiếng Anh là RNA silencing có nghĩa là ức chế sự phiên mã của gen thông qua việc phóng thích các tiểu phân tử ức chế RNA (siRNA) với chiều dài khoảng 21-23 trình tự nucleotide vào trong tế bào sống.

Cơ chế phân tử của câm gen được chia thành hai giai đoạn dựa trên các nghiên cứu di truyền trên tuyến trùng *C.elegans*, cây trồng và các nghiên cứu sinh hoá trên loài ruồi giấm *Drosophila* (Bass, 2000). Ở giai đoạn đầu tiên,

phân tử RNA kép (dsRNA) bị phân huỷ bởi một enzyme thuộc họ RNase-III hay còn gọi là DICER (Bernstein *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2000; Kadotani *et al.*, 2004) thành những đoạn ngắn hơn có chiều dài khoảng 21-25 trình tự nucleotide còn được gọi là tiểu phân tử ức chế RNA (siRNA) (Elbashir *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000). Trong giai đoạn sau, siRNA sẽ kết hợp với phức hợp protein thành một phức hợp ức chế RNA (RISC-RNA induced silencing complex) (Hammond, 2000). RISC hoạt hoá sẽ sử dụng phân tử siRNA chuỗi đơn để dò tìm các phân tử RNA thông tin (mRNA) đích nhằm phá huỷ chúng bằng các enzyme nội sinh (Hammond, 2001). Sự phân huỷ phân tử RNA thông tin sẽ xảy ra ở giữa vùng có kết với chuỗi đơn phân tử siRNA (Hình 1).



Hình 1. Cơ chế phân tử của RNAi. Các phân tử dsRNA có thể được đưa vào trong tế bào bằng các con đường nội, ngoại bào. Giai đoạn 1: các phân tử dsRNA bị phân cắt bởi enzyme Dicer thành các tiểu phân tử ức chế RNA (siRNA). Giai đoạn 2: các phân tử siRNA sẽ kết hợp với phức hợp RISC (RNA induced silencing complex), sau đó nó sẽ dò tìm các phân tử RNA thông tin đích và phân huỷ chúng bằng các enzyme nội sinh.

Khả năng ứng dụng lớn nhất của kỹ thuật câm gen là dùng để xác định chức năng của các gen trong các bộ di truyền của sinh vật. Bằng cách sử dụng thư viện cDNA, các phân tử RNA kép (dsRNA) được hình thành và đưa vào trong tế bào sống bằng nhiều phương pháp khác nhau như tiêm (Fire, 1998), ngâm trong dung dịch có chứa siRNA (Tabara, 1998) hoặc qua con đường thức ăn (Timmons, Fire, 1998). Tất cả các phương pháp này được áp dụng trên đối tượng *Caenorhabditis elegans* và *Drosophila melanogastera* với trên 90% các gen dự đoán đã

được phân tích chức năng. Trên đối tượng cây trồng, phân tử RNA kép (dsRNA) hay phân tử RNA kép dạng kẹp tóc (hairpin dsRNA) được đưa vào trong tế bào bằng nhiều con đường khác nhau như bắn phá bằng hạt vi mô (microprojectile bombardment) (Christou, 1997), bằng vi khuẩn *Agrobacterium* (Schob, 1997), vi rút (VIGS – virus induced gene silencing) (Baulcombe, 1999; Covey *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1998) và chuyển gen bằng các cấu trúc câm lặng gen có hiệu suất cao (Wesley *et al.*, 2001). Những nghiên cứu này đồng thời đã chỉ ra những

điểm yếu và những điểm mạnh của các phương pháp cảm gen chẳng hạn như các cấu trúc cảm gen có hiệu suất cao trên cây trồng như PHANNIBAL hay PHELLESGATE có thể cảm lặn hàng ngàn gen một cách có hiệu quả thông qua việc hình thành các phân tử RNA kép dạng kẹp tóc (hpRNA) hoặc các phân tử RNA kép dạng kẹp tóc có bổ sung đoạn intron (ihpRNA) (Wesley *et al.*, 2001).

Cho đến ngày nay, các nhà khoa học trên thế giới vẫn tiếp tục nghiên cứu về cảm gen trên nhiều đối tượng khác nhau nhằm tìm hiểu và làm sáng tỏ một cách chi tiết cơ chế của RNAi. Đồng thời các nhà khoa học cũng tiến hành ứng dụng kỹ thuật này trong việc khám phá chức năng của các gen hay ứng dụng chúng trong các nghiên cứu về trị liệu gen trong lĩnh vực y khoa, các ứng dụng trên cây trồng và vật nuôi trong nông nghiệp nhằm tạo ra các sản phẩm có phẩm chất tốt hơn cũng như là tìm hiểu bản chất của các cơ chế ở mức độ phân tử của các sinh vật trong nghiên cứu về sinh học. Mặc dù nghiên cứu về cảm gen chỉ mới bắt đầu khoảng vài thập niên trở lại đây nhưng hy vọng khoảng hơn 50 năm nữa các nghiên cứu về ức chế gen sẽ trả lời những câu hỏi liên quan đến những vấn đề chưa giải đáp được hay khám phá những điều mới hơn về cơ chế và ứng dụng của ức chế gen như Giáo sư Baulcombe đã từng đề cập trong tạp chí TRENDS in Biochemical Science. Trong tương lai gần các nhà khoa học sẽ đi sâu vào nghiên cứu mang tính ứng dụng của kỹ thuật này trong lĩnh vực điều chế thuốc nhằm ngăn chặn những bệnh hiểm nghèo như AIDS, cúm, dịch tả v.v... nhằm giải quyết tốt những vấn đề mang tính nhân loại.

NẤM GÂY BỆNH CÂY TRỒNG

Nấm ký sinh trên cây trồng được coi là một trong nhiều tác nhân phá hoại trong canh tác nông nghiệp. Hiện giờ người ta ước lượng có khoảng hơn 100,000 chủng nấm có khả năng gây bệnh trên cây trồng trong đó nhóm nấm sợi là tác nhân gây bệnh chính. Mỗi loại nấm gây bệnh có thể ký sinh một hoặc nhiều loại cây trồng và ngược lại. Nấm gây bệnh xâm nhiễm vào ký chủ bằng nhiều cơ chế xâm nhiễm khác nhau với mục đích lấy chất dinh dưỡng trực tiếp từ cây trồng thông qua một công cụ xâm nhiễm gọi là sợi phân nhánh nấm (hyphae). Sau đó chúng sẽ phóng thích các phân tử như enzyme, sắc tố melanin, glycerol, hydrophobin v.v... để phá hủy thành tế bào, tiếp cận và xâm nhiễm trên cây ký chủ. Khi nấm xâm nhiễm cây ký chủ, hiện tượng miễn

nhễm của cây trồng sẽ xuất hiện bao gồm các dạng phản ứng kháng như kháng mang tính hệ thống (SAR-systemic acquired resistance), kháng cục bộ (LAR-local acquired resistance). Hiện tượng kháng này sẽ xuất hiện trên cây ký chủ không tương thích với mầm bệnh và ngược lại trên các cây ký chủ tương thích với mầm bệnh. Phản ứng kháng chính là sự tự chết theo chương trình của tế bào khi gen kháng của cây ký chủ (gen R) nhận biết gen gây độc của mầm bệnh (gen avr) dẫn đến sự tự chết của tế bào theo cơ chế chương trình riêng nhằm ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh vào cây ký chủ.

Có rất nhiều phương pháp để kiểm soát và phòng chống bệnh do nấm gây ra chẳng hạn như lựa chọn giống cây trồng, vệ sinh đất trồng, luân canh, sử dụng thuốc trừ sâu v.v... Tuy nhiên trong thời đại ngày nay khi mà dân số thế giới đang ngày càng gia tăng một cách nhanh chóng thì nhu cầu đòi hỏi về an ninh lương thực đang là một vấn đề cấp bách, trong đó việc đòi hỏi nâng cao tính kháng của cây trồng đối với các tác nhân gây bệnh thực sự là một thử thách với các nhà khoa học. Chính vì lẽ đó, việc tìm hiểu và làm sáng tỏ mối tương tác giữa ký chủ và tác nhân gây bệnh là rất quan trọng, đặc biệt trong bối cảnh trình tự chuỗi của bộ gen của các nấm gây bệnh đã và đang được khám phá. Để làm được điều này nhiều phương pháp ở mức độ phân tử đã được nghiên cứu như tính kháng thông qua gen R theo lý thuyết “gene for gene” (Flor, 1971), kỹ thuật chuyển gen, các nghiên cứu về chu trình kháng mang tính hệ thống (SAR), chu trình tương tác với côn trùng liên quan đến acid jasmonic (JA), v.v. Việc xác định chức năng của các gen gây bệnh trong thế giới bộ gen của nấm bệnh cũng đóng vai trò rất quan trọng trong việc tìm hiểu mối tương quan giữa ký chủ và tác nhân gây bệnh. Trước đây các kỹ thuật mang tính truyền thống như gây đột biến, phân tích sự biểu hiện gen v.v... đã được sử dụng để phân tích chức năng của các gen trong bộ gen của các nấm gây bệnh cây trồng (Lorenz, 2002; Sweigard, Ebbole, 2001). Tuy nhiên, việc khám phá hiện tượng cảm gen đầu tiên trên nấm sợi *Neurospora crassa* (Romano, Macino, 1992) cùng với những nỗ lực trong việc hoàn thiện trình tự bộ gen của các loài nấm gần đây đã dẫn đến hàng loạt những khám phá hiện tượng cảm gen trên các nấm sợi gây bệnh như *Cladosporium fulvum* (Hamada, Spanu, 1998); *Cryptococcus neoformans* (Liu *et al.*, 2001); *Mucor circinelloides* (Nicolas *et al.*, 2003); *Magnaporthe oryzae* (Kadotani *et al.*, 2003; Nakayashiki *et al.*, 2005); *Venturia inaequalis* (Fitzgerald *et al.*, 2004); *Aspergillus fumigatus* (Mouyna *et al.*, 2004);

Phytophthora infestans (Whisson *et al.*, 2005) v.v... mở ra những cơ hội mới không chỉ cho các nghiên cứu cơ bản mà còn cho cả những nghiên cứu mang tính ứng dụng góp phần làm giảm thiệt hại do nấm bệnh gây ra trên cây trồng.

CÁC CƠ CHẾ PHÂN TỬ CỦA HIỆN TƯỢNG CÂM GEN TRONG NẤM SỢI GÂY BỆNH

Kể từ khi khám phá hiện tượng câm lặng gen trên nấm *Neurospora crassa*, loại nấm này được các nhà khoa học xem như là một đối tượng chính cho các nghiên cứu tìm hiểu cơ chế phân tử của hiện tượng ức chế gen. Khi hai nhà khoa học người Mỹ Fire và Mello giải thích sự suy giảm của các phân tử RNA thông tin của gen nội sinh là do sự hiện diện của phân tử RNA kép (dsRNA), các nghiên cứu câm lặng gen trên nấm dần dần đã được làm sáng tỏ. Việc phát hiện các tiểu phân tử ức chế RNA (siRNA) được hình thành bởi quá trình chia cắt phân tử RNA kép (Zamore *et al.*, 2000) đã kích thích nhiều nỗ lực nghiên cứu trong việc xác định những enzyme giữ chức năng này. Một trong những enzyme được xác định gần đây thuộc họ RNaseIII có tên gọi là DICER với chức năng tạo ra các tiểu phức chất RNA khoảng 21-23 trình tự nucleotide, tiểu phức chất RNA này có khả năng phân huỷ mang tính chọn lọc các phân tử RNA tương đồng. Hiện tại trên nấm *Neurospora crassa*, người ta đã xác định 2 protein DICER là DCL1 và DCL2, trên nấm *Magnaporthe oryzae* là MDL1 và MDL2. Trong các loại protein đó thì các protein DL2 và MDL2 được xem là những protein chính có chức năng phân huỷ phân tử RNA kép (dsRNA) thành những tiểu phân tử ức chế (siRNAs) (Catalanotto *et al.*, 2004; Kadotani *et al.*, 2004). Song song với việc xác định các protein DICER trên nấm, những protein quan trọng khác cũng đã được làm sáng tỏ trên nhiều đối tượng như là protein Argonaute được xem là loại protein mà cấu trúc của nó có hai vùng chuyên biệt được đặt tên là Paz và Piwi giữ vai trò kết nối các tiểu phân tử ức chế RNA (siRNA) và phân huỷ các RNA thông tin bằng các enzyme nội sinh RNase H (Song *et al.*, 2004) hay RdRp (RNA dependent RNA polymerase) có chức năng là chuyển các phân tử RNA tự do (arberant RNA) trong tế bào thành các phân tử RNA kép (dsRNA). Trên nấm *N. crassa*, các nhà khoa học đã khám phá ra hai loại protein Argonaute liên quan đến cơ chế ức chế gen sau phiên mã (PTGS) bao gồm QDE-2 giữ vai trò ức chế gen (Fagard *et al.*, 2000) và protein QDE-1 giữ vai trò như là một enzyme RdRp (Cogoni, Macino, 1999). Trên nấm

Schizosaccharomyces pombe các nhà khoa học chỉ khám phá một loại protein DICER, RdRp và Argonaute có tên là Dcr1, Rdp1 và Ago1 trong cả hai cơ chế câm lặng gen trong giai đoạn phiên mã (TGS- transcriptional gene silencing) và sau phiên mã (PTGS- post-transcriptional gene silencing) (Sigova *et al.*, 2004). Thời gian gần đây khi mà trình tự chuỗi của các bộ di truyền nấm đang lần lượt được khám phá, các thành phần tương đồng liên quan đến chu trình ức chế gen cũng dần dần được phát hiện thông qua việc xác định số lượng các phân tử protein Dicer, Argonaute và RdRp trên các chủng loài nấm sợi đã được nghiên cứu có sự hiện diện của cơ chế câm lặng gen bằng các phương pháp tiếp cận so sánh bộ gen và phương pháp phân nhánh bộ gen (Nakayashiki *et al.*, 2006). Cho đến ngày nay các cơ chế RNAi trên nấm có thể được khái quát hoá bằng một thuật ngữ là câm gen phụ thuộc tương đồng (HDGS – homology dependent gene silencing). Cơ chế này có nghĩa là việc câm gen có thể đạt được bằng những phương pháp khác nhau như câm gen ngay trong quá trình phiên mã bằng đột biến điểm lặp lại (repeat-induced point mutation), methyl hoá tiền phân bào (MIP-methylation induced premeiotically) hoặc câm gen trong giai đoạn phiên mã ở trong nhân tế bào (transnuclear transcriptional gene silencing). Cơ chế câm gen sau phiên mã (PTGS) chẳng hạn như là hiện tượng ức chế (quelling) hay ức chế phân bào bằng DNA không hiệu chỉnh (meiotic silencing by unpaired DNA) (Cogoni, 2001; Nakayashiki, 2005; Nakayashiki *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2001). Gần đây ức chế gen đã được làm sáng tỏ trên nhiều chủng loại nấm bao gồm các ngành Ascomycota, Basidiomycota, và Zygomycota dựa trên các cuộc cách mạng về phân tử và sự đa dạng của các phân tử ức chế gen trên nấm cây trồng (Nakayashiki, 2005; Nakayashiki *et al.*, 2006).

CÁC KHUYNH HƯỚNG ỨNG DỤNG CÂM GEN TRÊN NẤM BỆNH GÂY HẠI CÂY TRỒNG

Nghiên cứu chức năng bộ gen

Gần đây, các nghiên cứu chức năng của bộ gen đang được chú ý trên nấm sợi bằng nhiều công cụ khác nhau. Như đã trình bày ở trên thì câm gen được xem là một công cụ rất tốt cho việc xác định chức năng của các gen trong bộ gen. Việc xác định chức năng của các gen đóng vai trò rất quan trọng trong việc tìm hiểu các cơ chế phân tử gây bệnh của nấm. Trong thời đại hậu bộ gen khi mà trình tự chuỗi của các bộ gen nấm lần lượt được giải mã như

Neurospora crassa (Galagan *et al.*, 2003), *Magnaporthe oryzae* (Dean *et al.*, 2005), *Aspergillus oryzae* (Machida *et al.*, 2005), *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), *Ustilago maydis*, *Aspergillus fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005), *Phaeosphaeria nodorum*, *Sclerotinia sclerotium*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Nectria haematococca* v.v... cũng đang sắp hoàn thành dưới sự hỗ trợ của các kỹ thuật đọc trình tự hiện đại, các gen đã dần được sử dụng rộng rãi trong việc xác định các chức năng gen trong các bộ gen của nấm. Tuy nhiên hiện nay hầu hết các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở mức độ khảo sát và đánh giá khả năng các gen thông qua việc sử dụng các cấu trúc các gen có khả năng tạo ra các phân tử RNA kép dạng kẹp tóc hay có sự bổ sung đoạn intron (hpRNA hay ihpRNA). Những cấu trúc này thể hiện khả năng các gen rất cao trên 80% thông qua việc sử dụng gen mẫu GFP cũng như kiểm tra khả năng các gen trên những gen nội sinh khác. Tuy nhiên những cấu trúc này lại có một nhược điểm là không thể ứng dụng để khảo sát chức năng của các gen trong bộ gen ở số lượng lớn. Đó chính là do những khó khăn về mặt thời gian và kỹ thuật trong việc đưa hai đoạn gen giống nhau về trình tự theo chiều đối đầu nhau cũng như đòi hỏi phải gắn kết hai lần vào trong cấu trúc ức chế dưới sự điều khiển của một promoter. Chính vì thế một phương pháp khác được nghĩ đến là sử dụng cấu trúc ức chế dưới sự điều khiển của hai promoter có trình tự chuỗi giống hoặc khác nhau theo chiều đầu đầu. Cấu trúc này chỉ đòi hỏi chèn một lần duy nhất đoạn gen cần ức chế ở giữa hai promoter. Dưới sự điều khiển của hai promoter này, hay phân tử RNA sẽ bắt cặp với nhau hình thành phân tử RNA kép (dsRNA) tham gia vào chu trình các gen. Tuy nhiên điểm yếu của cấu trúc này chính là hiệu suất các gen không cao bằng cấu trúc một promoter có khả năng tạo thành phân tử RNA kép dạng kẹp tóc (hpRNA). Các nghiên cứu trên nấm đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*, đã chỉ ra rằng khả năng các gen nhiều nhất của cấu trúc hai promoter là khoảng 40-60% so với đôi chúng. Mặc dù cấu trúc hai promoter có thể các gen hoàn toàn kiểu hình nhưng với tỉ lệ ít hơn so với cấu trúc một promoter. Điều này được chứng minh trong các thí nghiệm đánh giá hiệu quả các gen trên nấm đạo ôn thông qua việc sử dụng gen mẫu eGFP (enhanced green fluorescence protein) và gen nội sinh PKS có vai trò trong việc hình thành một trong nhiều yếu tố liên quan đến việc xâm nhiễm của nấm là sắc tố melanin. Để chứng minh ở mức độ phân tử khả năng các gen của cấu trúc này, phương pháp phân tích Northern thường được dùng để đánh giá

hàm lượng phân tử RNA thông tin của gen eGFP và PKS cũng như phân tích sự hiện diện của các tiểu phân tử các gen RNA (siRNA). Kết quả cho thấy có sự suy giảm hoặc biến mất hoàn toàn các phân tử RNA thông tin của các gen GFP và PKS trên những mẫu nấm thể hiện kiểu hình các gen và ngược lại trên các mẫu nấm không thể hiện kiểu hình các gen. Các siRNA cũng được tìm thấy trong các mẫu nấm bị các gen và ngược lại. Một điểm mạnh nữa của cấu trúc này trong việc ứng dụng xác định chức năng của gen là phương pháp đồng các gen. Phương pháp này sử dụng gen eGFP làm gen chỉ thị để xác định sự các gen của gen thứ hai. Nguyên lý của phương pháp này khá đơn giản là thông qua sự phiên mã của hai đoạn promoter để hình thành phân tử RNA sợi kép của gen GFP và gen chủ đích. Khi gen eGFP bị các gen sẽ dẫn đến sự các gen chủ đích mà ta muốn tìm hiệu chức năng của nó. Phương pháp này góp phần tiết kiệm sức lao động và tiền bạc khi chúng ta phải dò tìm các mẫu nấm bị các gen mà hoàn toàn không biết về kiểu hình của chúng. Mối tương quan giữa eGFP và gen chủ đích cũng đã được đánh giá thông qua việc sử dụng gen xylanase (XYL) và gen PKS. Mặc dù có khả năng các gen hai gen cùng một lúc nhưng hiện tượng các gen một trong hai gen vẫn xảy ra mà vẫn chưa giải thích được nguyên nhân. Tuy nhiên khả năng dùng phương pháp này lại rất tiện lợi cho việc xác định các mẫu nấm các gen dựa vào đánh giá cường độ fluorescence của gen eGFP. Cách tiếp cận này cũng đã được áp dụng trong việc xác định chức năng của 37 gen liên quan đến chu trình can-xi trong tế bào nấm, của các họ gen liên quan đến các men phân huỷ thành tế bào (CWDEs – Cell Wall Degrading Enzymes) (Nguyen *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2012). Bằng cách chọn những mẫu nấm thể hiện các gen eGFP mạnh nhất ra có thể thu được các mẫu nấm có sự các gen chủ đích khi tiến hành phân tích bằng phương pháp Northern hay RT-PCR. Sự thành công của phương pháp này sẽ mở ra nhiều cơ hội mới cho các nhà nghiên cứu về nấm có thể tìm hiểu sâu hơn chức năng của các gen trong bộ gen của các chủng loại nấm khác nhau.

Loại bỏ sự xâm nhiễm độc tố mycotoxin trong các sản phẩm nông nghiệp

Nấm bệnh *Aspergillus* và *Fusarium* có khả năng tạo ra độc tố mycotoxin trong suốt trình xâm nhiễm hạt và các loại cây ngũ cốc dẫn đến những thiệt hại trực tiếp và cả gián tiếp lên nông nghiệp và sức khỏe của con người. Một trong những ứng dụng của kỹ thuật các gen là khả năng ức chế của nó đối

với gen tạo ra dạng độc tố này. Đó chính là gen aflR có khả năng sinh tổng hợp aflatoxin trong hai loại nấm này (Woloshuk *et al.*, 1994). Thông qua việc hình thành cấu trúc câm lặng dưới sự điều khiển của một promoter cùng với hai gen có kích thước khoảng 670 bp và trình tự chuỗi giống nhau được chèn vào giữa đoạn promoter và terminator theo chiều đầu đối đầu. Mục đích của việc hình thành cấu trúc này là để tạo ra phân tử RNA kẹp tóc như đã trình bày ở các phần trên trong bài viết này. Khả năng câm gen trên hai chủng loại nấm này cũng đã được minh chứng trước đây thông qua sự hiện diện của các siRNA có kích thước 25 trình tự nucleotide của gen aflR (Hammond, Keller, 2005). Bằng cách chuyển gen thông qua phương pháp PEG, cấu trúc câm gen sẽ liên kết với bộ gen của hai nấm trên và gây ức chế sự hình thành độc tố mycotoxin trên ba loại nấm gây bệnh là *A. parasiticus*, *A. flavus*, và *F. graminearum*. Minh chứng ở mức độ phân tử khả năng câm gen được thể hiện qua phân tích hàm lượng phân tử RNA thông tin của gen aflR. Phân tích này cho thấy không có sự hiện diện của mRNA aflR trong các mẫu bị câm lặng so với đối chứng. Không những thế sự câm lặng này rất bền thông qua thí nghiệm lây nhiễm trên cây bắp đối với nấm *Aspergillus* và lúa mạch đối với nấm *Fusarium* (McDonald *et al.*, 2005). Qua thí nghiệm này đã cho thấy được khả năng ứng dụng của câm gen vốn được coi như là một công cụ nghiên cứu rất hữu hiệu cho phép các nhà khoa học có thể can thiệp sâu hơn vào trong bộ di truyền một cách dễ dàng hơn so với các phương pháp trước đây nhất là trong giai đoạn hậu bộ di truyền ngày nay.

Nghiên cứu các chu trình phân tử liên quan đến sự xâm nhiễm của nấm cũng như là độc tính của các gen

Một trong những khả năng ứng dụng của câm gen là tìm hiểu và làm sáng tỏ các chu trình phân tử liên quan đến cơ chế xâm nhiễm của nấm trên cây trồng. Yếu tố quan trọng trong việc quyết định sự xâm nhiễm của nấm là khả năng nhận và phản hồi các tín hiệu từ cây trồng không chỉ ngay từ giai đoạn đầu mà cả những giai đoạn sau của sự lây nhiễm. Đó chính là các tín hiệu nội và ngoại tế bào mà cho đến bây giờ các nhà khoa học vẫn đang tập trung tìm hiểu và làm sáng tỏ mối liên quan của chúng đến khả năng lây nhiễm của nấm. Có rất nhiều yếu tố liên quan đến tín hiệu này chẳng hạn như các phân tử tiếp nhận của nấm sẽ giữ một vai trò nhận biết bề mặt của cây ký chủ hay nhận biết tín hiệu dinh dưỡng của cây trồng. Gen mã hoá chức năng này và liên quan đến khả năng lây nhiễm là gen PTH11 thông qua phương pháp tiếp cận Forward Genetics trên nấm gây bệnh

đạo ôn, *M. oryzae* (DeZwaan *et al.*, 1999). Một yếu tố khác liên quan đến khả năng hình thành giác bám, gây sưng tế bào, biệt hoá tế bào, xâm nhiễm và cuối cùng là phát sinh bệnh chính là các protein G (heterotrimeric GTP-binding proteins). Các protein G này có ba nhóm phụ là alpha, beta và gamma. Trong ba nhóm phụ này người ta đã xác định được nhóm phụ alpha là quan trọng nhất trong giai đoạn đầu của vòng đời nấm bệnh và có liên quan đến khả năng lây nhiễm của nấm trên cây ký chủ. Ngày nay các nhà khoa học đã xác định được gen liên quan đến protein G thuộc nhóm alpha như gen MAGB của nấm *Magnaporthe oryzae* (Liu *et al.*, 1997), CPG-1 của nấm *Cryphonetria parasitica* (Choi *et al.*, 1995), BCG1 và BCG2 của nấm *Botrytis cinerea* v.v.... Ngoài ra các protein G còn có liên quan đến các chu trình khác như cAMP, MAP kinases, các protein liên quan đến chu trình can-xi. Những chu trình này lại liên quan đến khả năng kết dính của các bào tử nấm, các enzyme phá vỡ thành tế bào, các độc tố v.v.... Để xác định các gen liên quan đến những yếu tố và chu trình này, các nhà khoa học trước đây thường dùng các phương pháp Forward Genetics như REMI, transposon tagging hay T-DNA v.v... Tuy nhiên khi trình tự chuỗi bộ di truyền của các nấm đã được xác định thì các phương pháp Reverse Genetics trong đó có kỹ thuật câm lặng gen lại thể hiện tính ưu việt. Bằng phương pháp so sánh tính tương đồng của các gen dựa trên cơ sở dữ liệu bộ di truyền của các chủng nấm, các nhà khoa học sẽ dễ dàng trong việc xác định được trình tự các gen trên từng đối tượng nghiên cứu. Thông qua kỹ thuật câm lặng gen, các nhà nghiên cứu sẽ nhanh chóng câm lặng những gen đó và từ đó sẽ dễ dàng trong việc xác định chức năng mong muốn của từng gen. Ngày nay các nhà nghiên cứu sinh học phân tử trên đối tượng nấm bệnh tập trung chủ yếu vào các yếu tố phiên mã (transcription factors) cũng như là xác định các gen liên quan đến các tín hiệu lây nhiễm nhằm đánh giá toàn bộ bộ di truyền những gen nào của nấm có khả năng gây bệnh trên cây trồng. Kỹ thuật câm lặng gen sẽ giải quyết được các vấn đề này ở mức độ quy mô và nhanh chóng hơn các phương pháp khác. Các ví dụ trong việc ứng dụng câm lặng gen trong hướng nghiên cứu này là câm lặng gen MPG1 liên quan đến việc hình thành hydrophobin dẫn đến giảm khả năng lây nhiễm của nấm đạo ôn trên lúa bằng cấu trúc câm lặng pSilent-1 hay câm lặng alpha-tomatine liên quan đến enzyme phá huỷ thành tế bào bằng phương pháp ức chế gen trên cây cà chua cũng dẫn đến việc hạn chế khả năng lây nhiễm của nấm *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicii* (Nakayashiki *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2002). Một ví dụ nữa trong việc ứng dụng câm gen

nhằm tìm hiểu khả năng hình thành bào tử xâm nhiễm của nấm gây bệnh sương mai trên khoai tây *Phytophthora infestans*. Các nhà khoa học đã sử dụng cảm gen để kiểm tra mối liên quan của gen piCdc14 trong việc hình thành bào tử. Kết quả phân tích ở mức độ phân tử cho thấy rằng khi gen piCdc14 bị câm lặng thì hàm lượng RNA thông tin của gen đó bị suy giảm hoàn toàn dẫn đến ức chế việc hình thành các bào tử nấm ngay từ giai đoạn đầu (Ah Fong, Judelson, 2003). Cảm gen cũng được dùng để xác định chức năng của các liên quan đến protein G thuộc cả hai nhóm alpha và beta trên nấm *Phytophthora infestans*. Trên nấm *Phytophthora infestans* có hai gen liên quan đến protein G là Piggp1 thuộc nhóm phụ alpha và Piggp1 thuộc nhóm phụ beta. Việc hình thành các bào tử trên các đột biến Piggp1 bị câm lặng giảm còn 20-45% so với đối chứng dẫn đến giảm khả năng gây bệnh trên lá khoai tây còn 3-14% so với 77% của đối chứng (Latijinhouwers *et al.*, 2004). Trong khi đó các đột biến Piggp1 bị câm lại liên quan đến khả năng phát triển và hình thái bào tử do xuất hiện một số lượng lớn các bào tử nang bị biến dạng. Yếu tố này cũng ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của nấm *Phytophthora* trên cây trồng (Latijinhouwers *et al.*, 2003). Những ví dụ trên cho thấy khả năng ứng dụng cảm gen trong việc xác định các gen liên quan đến tính gây bệnh của nấm là rất lớn. Công cụ này sẽ giúp các nhà khoa học nhanh chóng xác định và tìm hiểu những bí ẩn chưa giải thích được trong mối tương tác giữa ký chủ và tác nhân gây bệnh không những chỉ trên đối tượng gây bệnh như nấm, tuyến trùng, virus, côn trùng và cây trồng mà còn trên cả đối tượng người và động vật.

Cảm gen thông qua ký chủ trên nấm gây bệnh cây trồng

Thời gian gần đây một kỹ thuật cảm gen thông qua ký chủ (HIGS – Host Induced Gene Silencing) đã được nghiên cứu và phát triển. Cơ chế của kỹ thuật này chính là đưa cấu trúc cảm gen mang gen đích liên quan đến khả năng lây nhiễm của tác nhân gây bệnh vào trong cây trồng để tạo ra các phân tử RNA nhỏ chuyên biệt. Khi các tác nhân gây bệnh tấn công cây trồng, các phân tử RNA nhỏ này sẽ chuyển vào chúng từ cây trồng và làm câm các gen liên quan đến khả năng hình thành các cấu trúc xâm nhiễm, phát triển và độc tính của tác nhân gây bệnh dẫn đến giúp làm giảm các triệu chứng bệnh trên cây trồng (Hình 2). Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng HIGS là một công cụ rất hiệu quả giúp bảo vệ cây trồng khỏi sự tấn công, lây nhiễm của các

tác nhân gây bệnh (Baum *et al.*, 2007; Dubreuil *et al.*, 2009; Escobar *et al.*, 2002; Escobar, Dandekar, 2003; Fairbairn *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2006; Viss *et al.*, 2003). Hiện nay, có rất nhiều nỗ lực trong việc nghiên cứu ứng dụng HIGS đối với nấm gây bệnh trên cây trồng. Nowara và đồng tác giả (2010) đã chỉ ra rằng sự biểu hiện của phân tử dsRNA Avr10 (một gen dạng effector của nấm bệnh *Blumeria graminis*) trên các giống lúa mì và lúa mạch giúp làm giảm sự lây nhiễm của nấm bệnh *Blumeria graminis* (Nowara *et al.*, 2010). HIGS cũng được ứng dụng thành công trong việc ngăn chặn sự lây nhiễm của nấm *Puccinia striiformis f.sp. tritici* và *Fusarium oxysporum* trên cây trồng (Hu *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015). Các kết quả này đã chỉ ra rằng các phân tử RNA nhỏ có thể dịch chuyển từ tế bào thực vật sang tế bào nấm trong suốt quá trình xâm nhiễm và làm câm lặng một cách hiệu quả các gen liên quan đến khả năng gây bệnh của nấm. Chính vì vậy HIGS hứa hẹn là một công cụ hữu hiệu trong việc ngăn chặn sự tấn công của các tác nhân gây bệnh trên cây trồng trong tương lai gần.

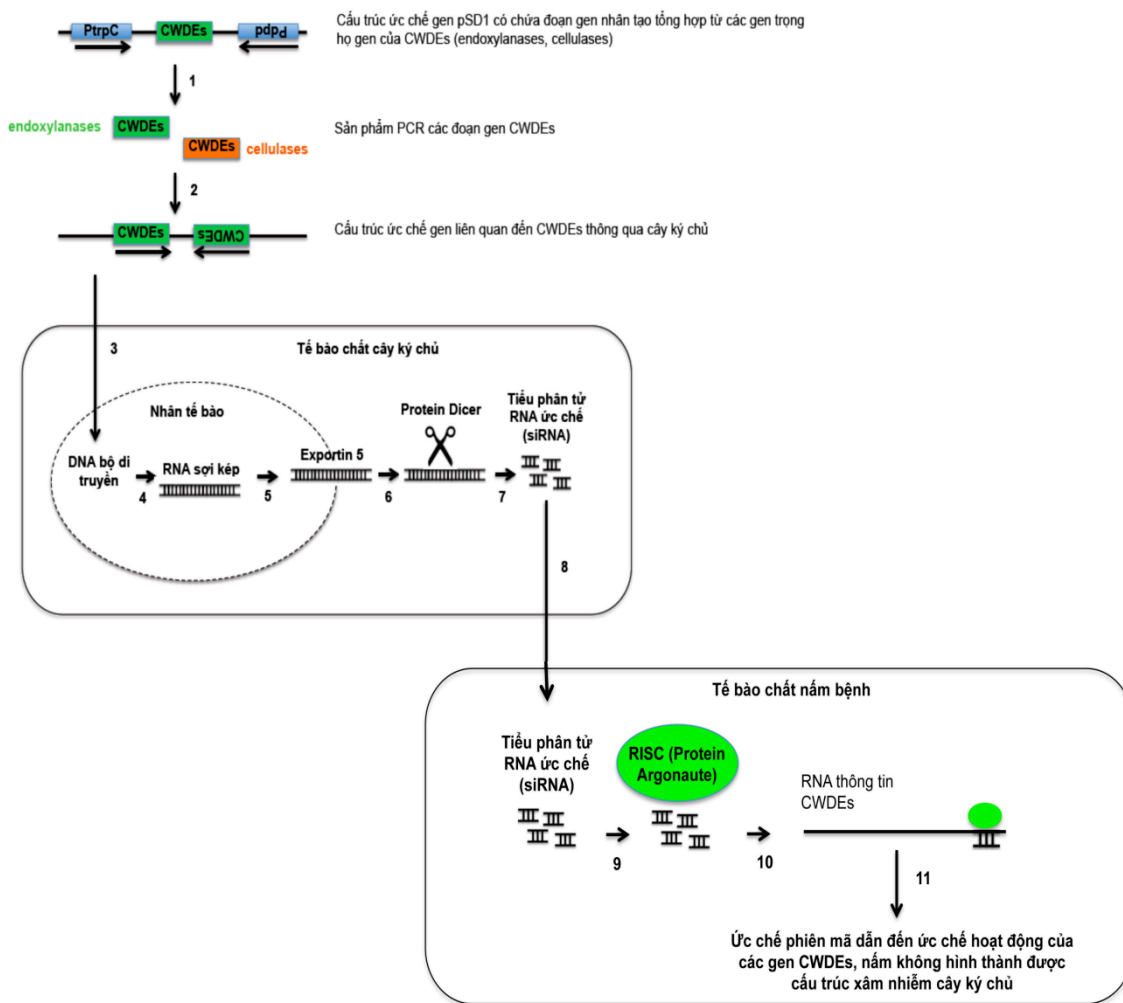
KẾT LUẬN

Mặc dù cho đến ngày nay cảm gen chỉ mới được tập trung nghiên cứu trên một số chủng loài nấm điển hình nhưng nó đã và đang trở thành một công cụ hữu hiệu trong việc khám phá chức năng của các gen trong bộ gen của tất cả sinh vật. Với những tiến bộ đạt được trong việc khám phá trình tự chuỗi của bộ gen các sinh vật thông qua các phương pháp giải trình tự tiên tiến cũng như sự phát triển của các phương pháp liên quan đến sinh tin học, các nhà khoa học ngày nay nhanh chóng giải thích được những điều chưa biết về chức năng của các gen, khám phá những con đường liên quan đến việc lây nhiễm cũng như mối tương tác giữa chúng với nhau trong quá trình điều khiển và kiểm soát khả năng gây bệnh của nấm, giữa tác nhân gây bệnh và ký chủ v.v.. bằng công cụ cảm gen. Điều này góp phần củng cố thêm những kiến thức và hiểu biết về sinh bệnh học của thế giới các loài nấm. Trong tương lai gần các nhà khoa học sẽ xác định các gen liên quan đến việc lây nhiễm của nhiều loài nấm bệnh như *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans*, *Ustiligo maydis* v.v.... Việc xác định chức năng của các gen trong bộ di truyền giống như sự phân loại sách trong thư viện trong đó việc định dạng, trình tự chuỗi và chức năng của từng gen sẽ được phân loại theo từng chủng loài nấm bệnh. Từ đó các nhà khoa

học sẽ dễ dàng hơn trong việc tiếp cận thông tin di truyền của từng gen nhằm ứng dụng trong việc kiểm soát bệnh của nấm cũng như cho việc khai thác và sử dụng nấm trong nông nghiệp và công nghiệp thông qua các phương pháp tiên tiến ở mức độ phân tử. Những thành tựu đạt được bằng việc sử dụng cách tiếp cận này không chỉ góp phần làm sáng tỏ những điều chưa biết về thế giới các loài nấm mà còn góp

phần giải quyết tốt an ninh lương thực cho nhân loại trong thời đại bùng nổ dân số hiện nay.

Lời cảm ơn: Bài viết tổng quan được sự hỗ trợ một phần kinh phí từ dự án nghiên cứu quốc tế CRP/ICGEB với mã số CRP/VIET13-02 của Trung tâm Quốc tế Biến đổi Di truyền và Công nghệ Sinh học (ICGEB), Trieste, Ý.



Hình 2. Ứng dụng câm lặng gen thông qua ký chủ (HIGS) để tạo các giống chuyển gen kháng sự tấn công của nấm bệnh. (1) Các đoạn DNA nhân tạo của các nhóm enzyme phân hủy thành tế bào của nấm bệnh (CWDEs) sẽ được khuếch đại từ vector đã được phát triển trước đây [53,69]. (2) Các sản phẩm PCR sẽ được cắt bằng những enzyme phù hợp và gắn vào các vector dạng Gateway theo chiều đầu đối đầu. (3) Các cấu trúc câm lặng gen dạng HIGS sẽ được đưa vào cây trồng bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. (4) Các phân tử RNA sợi kép chuyên biệt (dsRNA) sẽ được tạo thành từ các cấu trúc câm lặng gen HIGS trong nhân của cây ký chủ. (5) các phân tử dsRNA sẽ được phóng thích ra ngoài nhân tế bào của cây ký chủ bằng exportin-5. (6) Các phân tử dsRNA sẽ bị phân cắt bằng một enzyme chuyên biệt gọi là Dicer. (7) Các phân tử dsRNA sẽ bị cắt thành các phân tử ức chế RNA nhỏ với kích thước 21 nucleotide (siRNAs). (8) Các phân tử siRNAs chuyên biệt sẽ di chuyển vào tế bào nấm gây bệnh cây trồng khi chúng tấn công trên bề mặt lá. (9) Các phân tử siRNA sẽ kết hợp với các protein Argonaute để hình thành các phức chất siRNA-RISC trong tế bào nấm bệnh. (10) Phức chất RISC-siRNA sẽ dò và gắn với các phân tử RNA thông tin đích. (11) Sự phiên mã của các gen đích như CWDEs sẽ bị ức chế thông qua hoạt động của RISC đưa đến làm câm lặng sự biểu hiện của những gen này vốn có liên quan đến việc hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của nấm bệnh (Nguyen *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2012).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ah Fong AMV, Judelson HS (2003) Cell cycle regulator Cdc14 is expressed during sporulation but not hyphal growth in the fungus-like oomycete *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* 50 (2): 487-494.
- Bass BL (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101: 235-8.
- Baulcombe DC (1999) Gene silencing: RNA makes no protein. *Curr Bio* 9: 599-601.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Robert J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25: 1322-1326.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-6.
- Catalanotto C, Pallotta M, ReFalo P, Sachs MS, Vayssie L, Macino G, Cogoni C (2004) Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Bio* 24: 2536-2545.
- Choi GH, Chen BS, Nuss DL (1995) Virus mediated or transgenic suppression of a G protein alpha subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 305-309.
- Christou P (1997) Rice transformation: bombardment. *Plant Mol Bio* 35: 197-203.
- Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO* 15: 3153-3163.
- Cogoni C, Macino G (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399: 166-169.
- Cogoni C (2001) Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annu Rev Microbiol* 55: 381-406.
- Covey SN, Al-Kaff NS, Turner DS (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature*, 385: 781.
- Dean R., Talbot N., Ebbole D., Farman M., et al. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434: 980-86.
- DeZwaan T, Carroll A, Valent B, Sweigard J (1999) *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11: 2013-30.
- Dubreuil G, Magliano M, Dubrana MP, Lozano J, Lecomte P, Favery B, Abad P, Rosso MN (2009). Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematodes. *J Exp Bot* 60: 4041-4050.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Escobar MA, Leslie CA, McGranahan GH, Dandekar AM (2002) Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci* 163: 591-597.
- Escobar MA, Dandekar AM (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci* 8: 380-386.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H (2000) AGO1, QDE-2 and RDE1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1650-54.
- Fairbairn DL, Cavallaro AS, Bernard M, Mahalinga-lyer J, Graham MW and Botella JR (2007) Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta* 226: 1525-1533.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kotas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.
- Fitzgerald A, Kan JA, Plummer KM (2004) Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 963-971.
- Flor HH (1971) The current status of the gene for gene concept. *Ann Rev Phytopath* 9: 275-296.
- Galagan GE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, et al., (2003) Genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-68.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNA. *Science* 293: 1146-50.
- Hammond TM, Keller NP (2005) RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA dependent RNA polymerase. *Genetics* 169: 607-617.
- Hamada W, Spanu PD (1998) Co-suppression of the hydrophobin gene Hcf-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet* 259: 630-638.

- Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNA silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14302-14306.
- Hu Z, Parekh U, Maruta N, Trusov Y, Botella JR (2015) Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by host delivered RNA interference enhances disease resistance. *Front Chem* 3: 1-10.
- Ito S, Takahara H, Kawaguchi T, Tanaka S, Kameya-Iwaki M (2002) Post transcriptional silencing of the tomatinase gene in *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. *Phytopathology* 150: 474-480.
- Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y and Mayama S (2003) RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* MPMI 16: 769-775.
- Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004) One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA RNA-trigger RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. *J Biol Chem* 279 (43): 44467-44474.
- Kettin RF, Plasterk RH (2000) A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404: 296-8.
- Latijinhouwens M, Gover F (2003) A *Phytophthora infestans* G-Protein α -Subunit is involved in sporangium formation. *Eukaryotic Cell* 2 (5) : 971-977.
- Latijinhouwens M, Ligterink W, Vleeshouwens V, van West P, Gover F (2004) A G α subunit control zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiology* 51 (4): 925-936.
- Lohmann JU, Endl I, Bosch TC (1999) Silencing of developmental genes of Hydra. *Dev Biol* 214: 211-214.
- Lorenz MC (2002) Genomic approaches to fungal pathogenicity. *Curr Opin in Microbiol* 5: 372-378.
- Liu H, Cottrell TR, Pierini LM, Goldman WE, Doering TM (2001) RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 160: 463-470.
- Liu S, Dean RA (1997) G protein α subunit genes control growth, development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 1075-1086.
- Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, et al. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-61.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol* 25: 1307-1313.
- Martinez D., Larrondo L., Putnam N., Gelpke M., et al. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol* 22: 695-700.
- McDonald T, Brown D, Keller NP, and Hammond TM (2005) RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Mol Plant Micro Inter* 18 (6): 539-545.
- Misquitta L, Peterson BM (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1451-1456.
- Mouyna I, Henry C, Doering TL, Latge JP (2004) Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 237: 317-324.
- Nakayashiki H, Hanada S, Quoc NB, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in Ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol* 42: 275-283.
- Nakayashiki H (2005) RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS*, 579: 5950-5957.
- Nakayashiki H, Kadotani N, Mayama S (2006) Evolution and Diversification of RNA Silencing Proteins in Fungi. *J Molec Evol* 63: 127-135.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (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.
- Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14687-92.
- Nguyen QB, Kadotani N, Kasahara S, Tosa Y, Mayama S, Nakayashiki H (2008) Systemic functional analysis of calcium signaling proteins in the genome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a highthroughput RNA silencing system. *Mol Microbiol* 68: 1348-1365.
- Nguyen QB, Itoh K, Vu B V, Tosa Y, Nakayashiki H (2011) Simultaneous silencing of endo- β -1,4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Microbiol*, 81 (4): 1008-1019.
- Nicolas FE, Martínez ST, Ruiz-Vazquez RM (2003) Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO* 22 (15): 3983-3991.
- Nierman W, Pain A, Anderson M, Wortman J, et al. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438: 1151-56.

- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P (2010) HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* 22: 3130-3141.
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6: 3343-3353.
- Ruiz MT, Voinet O, Baulcombe DC (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-946.
- Sanchez Alvarado A, Newmark PA (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5049-54.
- Schob H, Kunz C, Meins JR (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet* 256 (5): 581-5.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305 (5689): 1434-7.
- Shin PKT, Raju NB, Zichler D, Matzenberg RL (2001) Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* 107: 905-916.
- Sigova A, Rhind N, Zamore PD (2004) A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 18: 2359-2367.
- Sweigard JA, Ebbole DJ (2001) Functional analysis of pathogenicity genes in a genomics world. *Curr Opin in Microbiol* 4: 387-392.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282: 430-1.
- Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by digested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol Biol* 15: 383-391.
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in Petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299.
- Vu BV, Itoh K, Nguyen QB, Tosa Y, Nakayashiki H (2012) Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 25(9): 1135-1141.
- Viss WJ, Pitrak J, Humann J, Cook M, Driver J, Ream W (2003) Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Mol Breed* 12: 283-295.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27(6): 581-590.
- Whisson SC, Avrova AO, Van West P, Jones JT (2005) A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol* 6(2): 153-163.
- Woloshuk CP, Foutz KR, Brewer JF, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA (1994) Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 60: 2408-2414.
- Yin C, Jurgenson J, Hulbert S (2010) Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis f.sp.tritici*. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 554-561.
- 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.

PERSPECTIVES OF RNAi STUDIES IN PLANT PATHOGENIC FUNGI

Nguyen Bao Quoc^{1,✉}, Nguyen Ngoc Bao Chau²

¹Research Institute for Biotechnology and Environment (RIBE), Nong Lam University, Ho Chi Minh City

²Ho Chi Minh City Open University

SUMMARY

RNA silencing, the phenomenon known as RNA interference (RNAi), co-suppression or post-

✉ Author for correspondence: E-mail: baoquoc@hcmuaf.edu.vn

transcriptional gene silencing (PTGS) and quelling, has become more popular in studies of its intrinsic roles and applications in many organisms or of gene functions in a whole genomic scale. Since the discovery of RNA silencing more two decades ago, this powerful technology has demonstrated its applicability in developing RNAi-based drugs for various diseases in human. RNA silencing is also of interest in basic and applied studies in agriculture, especially in plant protection to create crop varieties that are resistant to biotic and abiotic stresses. This review provides an overview of RNA silencing studies in filamentous fungi, the molecular mechanisms of RNA silencing in fungi, and also describes potential applications in plant protection potentially important for the agricultural industry and for global food security.

Keywords: *RNA silencing, pathogenic fungi, post transcription gene silencing, genome, gene function*