

# Tạo cây thuốc lá mang gen đa đoạn kháng virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV bằng kỹ thuật RNAi

Lê Thị Thủy<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Thu Hiền<sup>2</sup>,  
Phạm Thị Vân<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 7 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 8 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 19 tháng 9 năm 2014

**Tóm tắt:** RNAi là phương pháp sử dụng rộng rãi để phát triển các cây thuốc lá chuyển gen kháng virus phổ rộng giúp giảm đáng kể thiệt hại về năng suất do virus gây ra. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành thiết kế vector chuyển gen nhị thể pGWTCYS mang cấu trúc RNAi lặp lại đoạn gen TCYS đảo chiều có ngăn cách một đoạn intron. Đoạn gen TCYS mang đa đoạn gen chức năng không đầy đủ của 4 loại virus gây hại phổ biến nhất trên cây thuốc lá ở Việt Nam là TMV (*Tobacco mosaic virus* – virus khảm thuốc lá), CMV (*Cucumber mosaic virus* – virus khảm dưa chuột), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus* – virus xoắn vàng lá cà chua) và TSWV (*Tomato spotted wilt virus* – virus héo đốm cà chua). Cấu trúc này được chuyển vào 2 giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 và C9-1. Sau quá trình tái sinh và chọn lọc đã thu được 66 dòng cây (36 dòng K326 và 30 dòng C9-1) phát triển bình thường. Phân tích PCR cho thấy tất cả các dòng này đều dương tính với gen chuyển TCYS. Đánh giá tính kháng cả 4 loại virus nghiên cứu của các dòng thuốc lá chuyển gen này ở thế hệ T0 thu được 20/66 dòng (trong đó, 11 dòng K326 và 9 dòng C9-1) không có biểu hiện bệnh do những virus này gây ra sau lây nhiễm.

**Từ khóa:** TMV, CMV, TYLCV, TSWV, thuốc lá, RNAi

## 1. Mở đầu

Bên cạnh nấm và vi khuẩn, virus là một trong 3 nguyên nhân chính gây nên bệnh truyền nhiễm ở thực vật. Cho đến nay, đã có gần 1000 loài virus hại thực vật được phát hiện, trong khi chưa có loại thuốc bảo vệ thực vật nào có thể chống lại bệnh virus gây nên mối lo ngại lớn cho nền nông nghiệp. Con người chỉ có thể hạn

chế tác hại của virus và kiểm soát nó ở mức độ nhất định thông qua một số biện pháp mang tính chất phòng trừ như sử dụng giống sạch bệnh hay các biện pháp canh tác [1].

Hiện nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc tạo cây trồng chuyển gen kháng virus được xem là một biện pháp hiện đại và hữu hiệu trong việc chống lại bệnh virus hại thực vật. Dựa trên chiến lược “tính kháng được tạo ra từ tác nhân gây bệnh” kết hợp với việc phát hiện ra cơ chế gây bất hoạt gen sau phiên

\*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-986466739  
Email: hienthuy20@gmail.com

mã (RNAi), nhiều nghiên cứu nhằm tạo ra các vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi chứa các trình tự gen của virus gây bệnh đã được thực hiện. Bằng chứng đầu tiên về sự kháng virus thông qua RNAi được cung cấp bởi Waterhouse và cộng sự (1998) [2], kháng lại virus PVY (*Potato virus Y*) trong cây thuốc lá chuyển gen. Cho tới nay, đã có rất nhiều thành công trên nhiều hệ thống vật chủ khác để kháng lại một vài loại virus [3- 6].

RNAi là cơ chế tự nhiên của tế bào sống có thể làm bất hoạt một gen nào đó, cơ chế này tìm thấy ở cả nấm, thực vật và động vật [2, 7]. Ở thực vật, RNAi có thể được thực hiện bằng cách chuyển gen có cấu trúc biểu hiện sự phiên mã cao RNA sense, anti-sense hoặc RNA kẹp tóc bổ sung chính nó (hairpin RNA, hpRNA) mà chứa trình tự tương đồng với gen đích [8, 9].

Bệnh khảm lá là bệnh phổ biến nhất trên cây thuốc lá làm giảm từ 35%-65% năng suất cây trồng, bệnh xuất hiện do sự gây hại của 2 loại virus là TMV và CMV [1]. Đây là 2 loại virus có phổ kí chủ rộng, khả năng chống chịu cao và lan truyền dễ dàng qua tiếp xúc cơ học giữa cây bệnh và cây khỏe. Về mặt di truyền, genome của 2 virus đều là ARN đơn dương [10], trong đó gen mã hóa cho protein vỏ (coat protein-CP) của virus, loại protein đóng vai trò quan trọng trong sự dịch chuyển của virus, trong quá trình truyền bệnh và phân hóa triệu chứng trên cây bệnh [11-13]. Với vai trò của nó, gen CP thường được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho tạo cây trồng chuyển gen kháng virus theo cơ chế RNAi.

Nhóm bệnh phổ biến tiếp theo trên cây thuốc lá cũng do virus gây hại là bệnh xoắn ngọn. TYLCV và TSWV là nguyên nhân chính gây nên triệu chứng xoắn lá, xoắn ngọn trên cây thuốc lá. Là nhóm virus đa thực gây hại trên nhiều đối tượng cây trồng thuộc họ Cà, đặc biệt như cà chua, thuốc lá,.. [14, 15] và truyền bệnh nhờ môi giới. Trong đó, virus xoắn vàng lá cà

chua TYLCV thuộc chi *Begomovirus*, họ Geminiviridae được phát hiện lần đầu tiên ở Israel vào năm 1939 [16]. Các virus trong chi *Begomovirus* được chia làm 3 nhóm chính dựa vào cấu trúc genome của chúng bao gồm loại hai vòng gen - thể dipartite, loại một vòng gen nhưng dịch mã thành hai khung đọc riêng biệt - thể monopartite và loại một vòng gen kèm DNA vệ tinh [17- 19]. TYLCV được lan truyền nhờ loài bọ phấn *Bemisia tabaci*, là loài côn trùng có sức sinh sản nhanh và mạnh. Genome của TYLCV gồm 6 gen chức năng đó là các gen V1 (CP), V2 (pCP), C1, C2, C3, C4. Các gen trong hệ gen của TYLCV có thể nằm trên cùng một vòng DNA-A hoặc hai vòng DNA-A và DNA-B riêng biệt tùy chủng virus và ngăn cách với nhau bởi một vùng liên gen khoảng 150 - 250 nucleotide. TSWV – Virus héo đốm cà chua thuộc loại *Tospovirus*, họ *Bunyaviridae*, có cấu tạo dạng thiên thể kích thước 70-90nm. Genome của TSWV gồm ba sợi RNA đơn âm (negative) hoặc lưỡng tính (ambisense) là sợi L (8,9 kb), sợi M (4,9 kb) và sợi S (2,9 kb). Sợi L mã hóa cho các replicase liên quan tới quá trình phiên mã của virus trong khi sợi M mã hóa cho protein vận chuyển (NSm) và protein vỏ ( $G_N$  và  $G_C$ ) – loại protein đóng vai trò quan trọng trong xâm nhiễm và truyền bệnh, còn sợi S mã hóa cho nucleoprotein (N) và protein ức chế quá trình bất hoạt gen (NSs) [20, 21]. Bộ trí là môi giới truyền bệnh hiệu quả nhất của virus này.

Việc sử dụng nguồn gen chức năng của virus chuyển vào cây trồng nhằm tạo ra cây kháng chính virus đó bằng công nghệ RNAi đã được ứng dụng thành công trong nhiều nghiên cứu ở Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam [22-24]. Ứng dụng công nghệ này, một cấu trúc RNAi đa đoạn mang các đoạn gen chức năng không đầy đủ của virus TMV, CMV, TSWV và TYLCV lặp lại đảo chiều đã được thiết kế nhằm tạo ra cây trồng chuyển gen có tính kháng virus

phổ rộng. Cấu trúc này đã được chuyển vào cây thuốc lá giống K326 và C9-1 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Những dòng thuốc lá chuyển gen thế hệ T0 đã được thu nhận và phân tích PCR và tính kháng virus.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### **Nguồn gen của virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV**

Các nguồn gen được phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp gồm: 1) Vector pENTRY/TCY mang 740 nucleotide của đoạn gen đa đoạn TCY (TCY chứa 304 nucleotide của CP TMV nối 255 nucleotide của CP CMV (Phạm Thị Vân et al, 2009) ghép nối với đoạn gen đa đoạn nhân tạo của TYLCV gồm 112 nucleotide của CP, 101 nucleotide C1/C2, 127 nucleotide C1/C4 và 130 nucleotide của  $\beta$ C1) 2) Vector tách dòng pENTR/TSWV mang 270 nucleotide đoạn gen mã hóa protein CP không đầy đủ của virus TSWV phân lập từ mẫu thuốc lá tại Tây Ninh.

#### **Chủng khuẩn và vector**

Vector chuyển gen pK7GWIWG2(II) [25], bộ kit nhân dòng pENTRY Directional TOPO®

Cloning Kit (Invitrogen), bộ kit thực hiện phản ứng Gateway Gateway® LR Clonase™ II Enzyme mix Kit (Invitrogen).

*E. coli* One Shot® TOP 10 (Invitrogen), chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 mang plasmid gây độc pGV2260, *E. coli* DH5 $\alpha$

#### **Vật liệu thực vật**

Cây thuốc lá thuộc 2 giống *Nicotiana tabacum* K326 và C9-1 nuôi cấy trong điều kiện *in-vitro* (được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học)

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### **Thiết kế môi cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen đa đoạn TCYS**

Để khuếch đại vùng gen quan tâm, các môi RNAi đã được thiết kế với môi TMV-CP-Fi-2 được bổ sung thêm 4 nucleotide CACC tương thích với đầu 3' GTGG của vector nhân dòng pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) còn hai môi cTYLCV-TSWV-Fi-1 và cTYLCV-TSWV-Ri-1 có 20 nucleotide gối lên nhau (10 nucleotit đầu 5' là của TMV còn 10 nucleotit đầu 3' là của TSWV). Kích thước của đoạn gen đa đoạn TCYS là 1000 bp.

Bảng 1. Danh sách môi

Tên môi	Trình tự (5'-3')
TMV-CP-Fi-2	CACCGAAGTTGAAAATCAGG
cTYLCV-TSWV-Fi-1	TATCATCAACAGTTCTGCGAGTTTTGC
cTYLCV-TSWV-Ri-1	GCAAAACTCGCAGAACTGTTGATGATA
TSWV-CP-Ri-1	TTGCCATAATGCTAGGAGGT

#### **Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi chứa gen đa đoạn kháng virus**

Kỹ thuật Gateway (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) được sử dụng để tạo cấu trúc

hpRNA. Đầu tiên, phản ứng PCR nhân từng đoạn gen TCY và CPi TSWV với cặp môi đặc hiệu tương ứng TMV-CP-Fi-2/cTYLCV-TSWV-Ri-1 và cTYLCV-TSWV-Fi-1/TSWV-

CPi-Ri-1 nhờ sử dụng enzyme Pfu DNA polymerase (Fermentas). Sản phẩm của phản ứng sau đó được tinh sạch, làm khuôn cho phản ứng PCR ghép nối hai đoạn gen lại với nhau với cặp mồi TMV-CP-Fi-2/TSWV-CPi-Ri-1. Đoạn gen ghép nối TCYS tiếp tục được gắn vào vector tách dòng pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>, sau đó, được dòng hóa trong tế bào khả biến *E.coli* One Shot TOP 10. Các dòng khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp dương tính ký hiệu là pENTCYS được nuôi, tách chiết và thu nhận plasmid.

Tiếp đó, phản ứng LR (LR là phản ứng tái tổ hợp giữa các vị trí *attL* and *attR* dưới sự xúc tác của enzym LR Clonase<sup>TM</sup> II) được thực hiện giữa vector cho pENTCYS có chứa các vị trí tái tổ hợp *attL* và vector tiếp nhận pK7GWIWG2(II) có chứa các vị trí gắn kết *attR*. Kết quả phản ứng LR sẽ tạo ra một vector biểu hiện thực vật nhị thể đặt tên là pGWTCYS. Vector này mang cấu trúc hpriRNA với hai vị trí chèn đoạn gen đa đoạn TCYS đảo chiều được ngăn cách bởi một đoạn intron dưới sự điều khiển của promoter 35S cauliflower mosaic virus. Cấu trúc pGWTCYS lần lượt được dòng hóa trong tế bào *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP 10 và cuối cùng nó được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện. Tế bào được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc cho vector là streptomycin 40mg/l, chloramphenicol 34 mg/l, kháng sinh chọn lọc vi khuẩn *A.tumefaciens* là rifamycin 50 mg/l. Những dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi, tách chiết plasmid để kiểm tra phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn *XbaI* và *HindIII*.

#### **Chuyển cấu trúc RNAi TCYS vào thuốc lá**

Cấu trúc RNAi TCYS được chuyển vào 2 giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 và C9-1 thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens* theo phương pháp của Topping có cải tiến (1998) [26].

#### **Phân tích cây chuyển gen ở thể hệ T0**

- PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

DNA tổng số được tách chiết nhanh từ lá các cây thuốc lá chuyển gen sau 3 tuần ra cây tại nhà lưới. Sử dụng cặp mồi TMV-CP-Fi-2/TSWV-CP-Ri-1 để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển nhờ phản ứng PCR.

- Đánh giá tính kháng virus bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo

Mỗi dòng thuốc lá chuyển gen T0 được nhân thành 2 cây, 1 cây được trồng để lây nhiễm TMV và CMV, 1 cây để lây nhiễm TYLCV và TSWV. Các cây thuốc lá được trồng ở nhà lưới đến khi cao khoảng 10-30cm thì tiến hành lây nhiễm virus TMV và CMV theo phương pháp của Herbers (1996) [27].

Đối với việc đánh giá tính kháng TYLCV và TSWV, phương pháp nhiễm bệnh qua môi giới được sử dụng. Những cây chuyển gen T0 được trồng trong điều kiện nhà lưới chứa môi giới truyền bệnh là bọ phấn (*Bemisia tabaci*) và bọ trĩ (*Stenchaetothrips biformis* Bagnall) với mật độ cao, đồng thời với sự có mặt của các cây WT (cây không chuyển gen) đã nhiễm bệnh TYLCV và TSWV và cây WT không nhiễm bệnh. Các dòng thuốc lá chuyển gen được bố trí trồng trong các ô thí nghiệm ở 2 bên nhà lưới, các cây WT nhiễm bệnh được trồng ở ô chính giữa. Thường xuyên kiểm tra mật độ bọ phấn và bọ trĩ trong nhà lưới thông qua việc quan sát và đếm số lượng trên lá cây. Triệu chứng bệnh sẽ được quan sát sau 30-40 ngày.

### **3. Kết quả và thảo luận**

#### **3.1. Thiết kế vector chuyển gen RNAi đa đoạn**

Thuốc lá là cây trồng chịu thiệt hại của nhiều loài virus khác nhau. Với mục đích tạo cây thuốc lá có khả năng kháng đồng thời nhiều

loại virus gây hại với nhiều khu vực trong cả nước, nghiên cứu đã thiết kế một đoạn gen đa đoạn chứa các vùng trình tự gen chức năng có độ bảo thủ cao của các virus TMV, CMV, TSWV và TYLCV. Sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi thiết kế đặc hiệu đoạn gen đa đoạn của 4 virus có kích thước khoảng 1000 bp đã được thu nhận (Hình 1). Đoạn gen này đã được gắn vào vector tách dòng pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> dưới sự xúc tác của enzyme topoisomerase có trên vector. Sản phẩm plasmid tái tổ hợp pENTCYS được dòng hóa vào tế bào E.coli One Shot TOP 10. Những dòng dương tính đã được thu nhận và xác định trình tự đoạn gen đa đoạn. Kết quả đọc trình tự cho thấy đoạn gen thu được có kích thước 1000 bp, với trình tự đúng như dự tính.

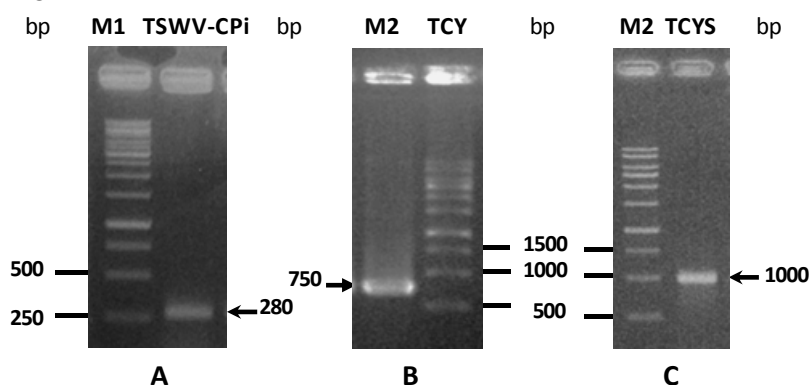
Kỹ thuật Gateway gồm 2 phản ứng LR và BP được xem là một phương pháp hiệu quả, nhanh và nhạy nhằm gắn đoạn DNA vào hệ thống vector hoặc trao đổi đoạn gen giữa hai hệ thống vector. Trong nghiên cứu này, phản ứng LR được thực hiện thành công giữa vector cho pENTCYS có chứa trình tự *attL* ở 2 đầu đoạn gen TCYS và vector tiếp nhận pK7GWIWG2(II) có chứa các vị trí *attR*. Kết quả phản ứng LR tạo ra một vector nhị thể (pGWTCYS) mang cấu trúc RNAi với hai vị trí

chèn đoạn gen TCYS theo chiều sense và antisense được ngăn cách bởi một đoạn intron, dưới sự điều khiển của promoter 35S (Hình 2). Dựa vào phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn *XbaI* và *HindIII*, những plasmid tái tổ hợp pGWTCYS (dòng khuẩn lạc 1 và 2 trên hình 2D) đã được lựa chọn để biến nạp vào thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng CV58C1.

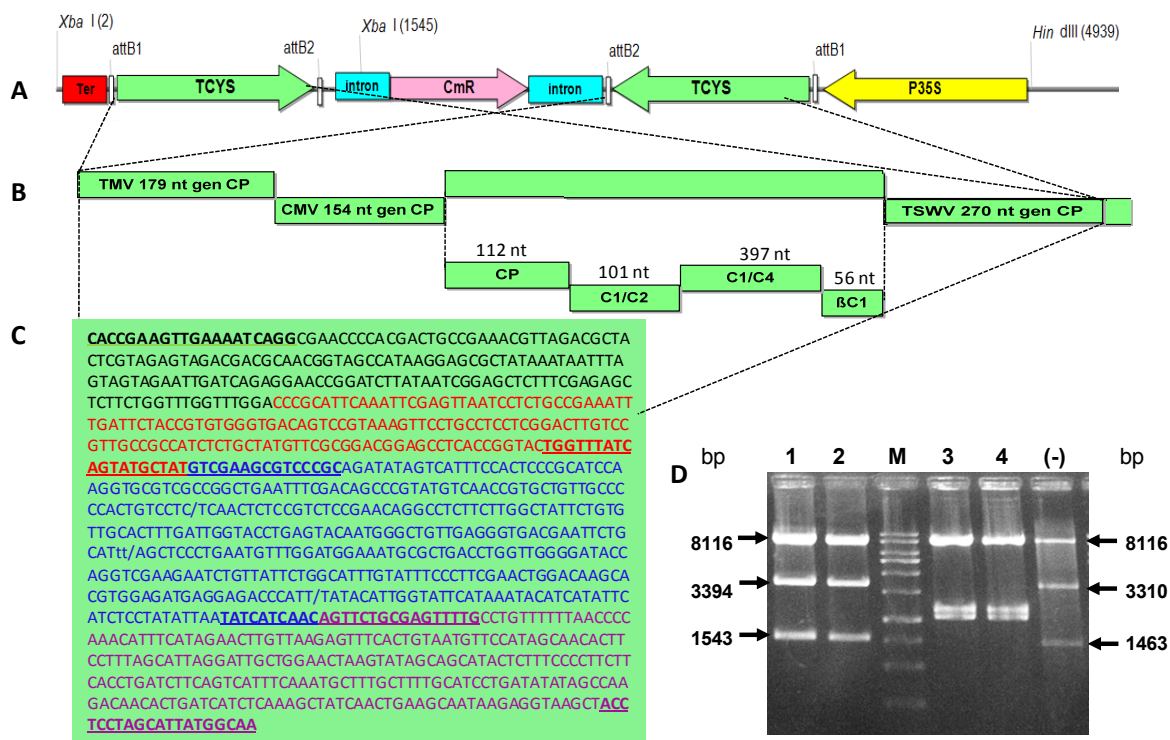
### 3.2. Tạo cây thuốc lá chuyển gen

Với mục đích kiểm tra hiệu quả biểu hiện của vector đã thiết kế và tạo cây thuốc lá kháng đồng thời nhiều virus, 2 giống thuốc lá được trồng phổ biến ở Việt Nam và miễn cảm với các virus này là K326 và C9-1 được lựa chọn để chuyển cấu trúc RNAi TCYS thông qua *A.tumefaciens*.

Sau quá trình chuyển gen, tái sinh và chọn lọc, có 36 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 của giống K326 và 30 dòng giống C9-1 sống sót trên môi trường chọn lọc và được chuyển ra trồng trong nhà lưới để phân tích PCR và đánh giá tính kháng virus. 76/100 dòng cho kết quả PCR dương tính với gen chuyển TCYS (Hình 3).



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR ghép nối tạo đoạn gen đa đoạn TCYS. A) Sản phẩm PCR nhân đoạn CPi TSWV bằng cặp mồi cTYLCV-TSWV-Fi-1 và TSWV-CP-Ri-1; B), Sản phẩm PCR nhân đoạn TCY bằng cặp mồi TMV-CP-Fi-2 và cTYLCV-TSWV-Ri-1 C), Sản phẩm PCR ghép nối TCY và CPi TSWV tạo đoạn gen đa đoạn TCYS. M1, GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA ladder (Fermentas); M2, 1 kb DNA ladder (Geneshun).



Hình 2. A. Sơ đồ cấu trúc đoạn RNAi TCYS: P35S, promoter 35S; attB1 và attB2, các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng LR. LB, left T-DNA border; RB, right T-DNA border; T35S, terminator 35S; CmR, gen kháng chloramphenicol. Vị trí các điểm cắt giới hạn của enzyme *Xba*I và *Hind*III. B. Cấu trúc đoạn gen đa đoạn TCYS. C. Trình tự đoạn gen đa đoạn TCYS: Màu đen là trình tự đoạn gen của TMV, màu đỏ là trình tự đoạn gen của CMV, màu xanh dương là trình tự đoạn gen đa đoạn nhân tạo của cTYLCV, màu tím là trình tự đoạn gen của TSWV và các trình tự in đậm và gạch chân là các vị trí môi. D. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pGWTCYS bằng enzyme *Xba*I và *Hind*III: M, 1 kb DNA ladder (Geneshun); 1 - 4, Dòng khuẩn lạc 1 - 4; (-), Đối chứng âm vector pK7GWIWG2(II).

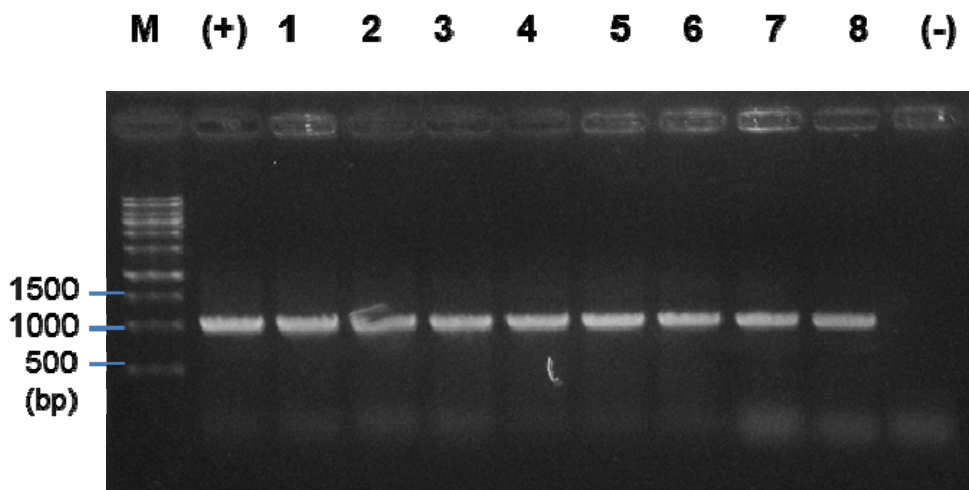
Các dòng cây chuyển gen này được đánh số theo thứ tự K1 đến K36 ở giống K326 và C1-C30 ở giống C9-1. Mỗi dòng được nhân invitro thành 2 cây, chia thành 2 nhóm và được trồng ở 2 nhà lưới khác nhau. Nhóm 1 tiến hành kiểm tra tính kháng TMV và CMV bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo, thống kê cây nhiễm bệnh thông qua quan sát triệu chứng bệnh cây xuất hiện sau lây nhiễm. Nhóm 2 được lây nhiễm TYLCV và TSWV nhờ môi giới truyền bệnh bộ phận và bộ trĩ được bố trí trong nhà lưới.

Kết quả kiểm tra tính kháng với virus TMV và CMV cho thấy, sau 3 lần lây nhiễm nhân tạo có 26/36 dòng cây chuyển gen K326 và 17/30 dòng cây C9-1 chuyển gen kháng hoàn toàn với cả TMV và CMV (hình 4).

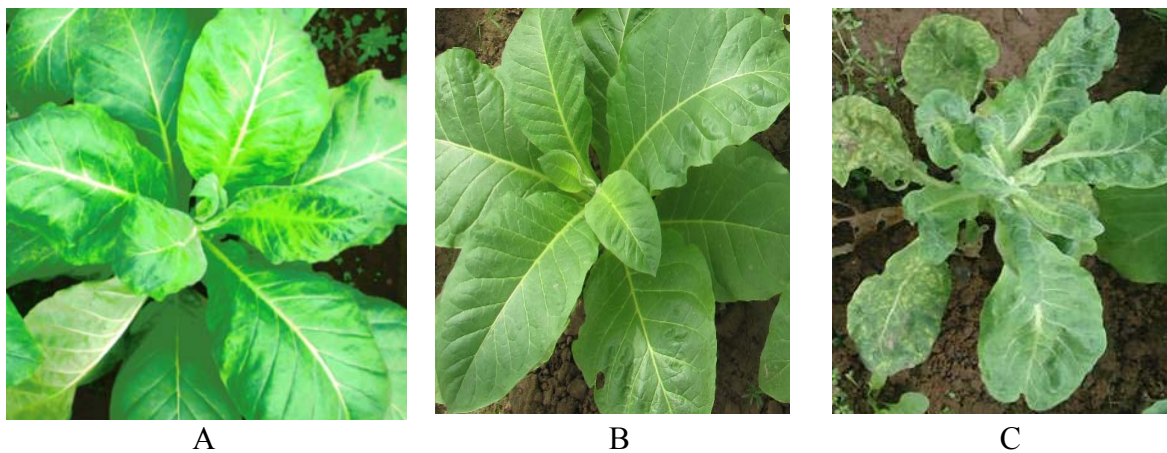
Ở nhà lưới thứ 2, kết quả lây nhiễm TYLCV và TSWV cho thấy có 14/36 dòng cây K326 và 11/30 dòng cây C9-1 không biểu hiện bệnh xoắn. Các cây biểu hiện bệnh có triệu chứng xoắn lá, xoắn ngọn, cây thấp lùn, mất khả năng sinh trưởng. So sánh với các dòng cây kháng virus TMV và CMV đã được thống kê ở

trên, chúng tôi thu được 11 dòng cây chuyển gen K326 và 9 dòng C9-1 đồng thời kháng TMV, CMV và không biểu hiện bệnh xoắn. Kết quả này cho thấy sự hoạt động hiệu quả của vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi TCYS

trong cây thuốc lá. Đây là bước quan trọng trong việc tạo ra cây thuốc lá kháng đồng thời nhiều loại virus giúp giảm đáng kể những thiệt hại do bệnh virus gây ra.



Hình 3. Sản phẩm PCR kiểm tra cây thuốc lá T0 chuyển gen TCYS  
M: Thang chuẩn 1Kb, (+): Mẫu PCR từ plasmid, 1-:8: PCR cây T0 chuyển gen TCYS bằng môi TMV-CP-Fi-2 và TSWV-CP-Ri-1. (-): mẫu đối chứng âm.



Hình 3. Hình ảnh các dòng thuốc lá chuyển gen sau 40 ngày lây nhiễm. A, Cây thuốc lá dòng K4 chuyển gen biểu hiện bệnh khảm; B, Cây chuyển gen dòng K18 không biểu hiện bệnh; C, Cây chuyển gen dòng K4 biểu hiện bệnh xoắn lá và ngọn.

Bảng 1. Kết quả chuyển cấu trúc RNAi TCYS vào thuốc lá thể hệ T0

Giống	Chuyển gen và tái sinh			Lây nhiễm nhân tạo TMV và CMV			Lây nhiễm TYLCV và TSWV qua môi giới			Số cây không biểu hiện cả 2 bệnh
	Số mẫu x số lần	Tổng số chồi tách	Số chồi phát triển	Số cây lây nhiễm	Số cây không biểu hiện bệnh	Tỷ lệ (%)	Số cây lây nhiễm	Số cây không biểu hiện bệnh	Tỷ lệ (%)	
WT-K326	5x2	9±1,4	0	10	0	0	10	0	0	0
K326	50x2	131,5±4,9	18±1,4	36	26	72,2	36	14	38,9	11
WT-C9-1	5x2	7±1,41	0	10	0	0	10	0	0	0
C9-1	50x2	87,5±3,5	15±2,8	30	17	56,7	30	11	36,7	9

Ghi chú: WT-K326, WT-C9-1: Cây thuốc lá không chuyển gen giống K326 và C9-1

#### 4. Kết luận

Vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi đã đoạn TCYS chứa các gen chức năng không đầy đủ của 4 loại virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV đã được thiết kế và chuyển thành công vào 2 giống thuốc lá K326 và C9-1. Phân tích tính kháng virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV của 66 dòng thuốc lá chuyển gen giống K326 và C9-1 ở thể hệ T0 thu được 20 dòng (gồm 11 dòng K326 và 9 dòng C9-1) không có biểu hiện bệnh do các virus này gây ra.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Nhà nước: “Nghiên cứu tạo giống thuốc lá kháng bệnh khảm lá và xoắn đọt bằng kỹ thuật chuyển gen”. Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học đã hỗ trợ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Vũ Triệu Mân, Giáo trình bệnh cây chuyên khoa, chuyên ngành Bảo vệ thực vật, NXB Nông Nghiệp, 2007.
- [2] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB, Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA, Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 13959-13964.
- [3] Di Nicola Negri E, Brunetti A, Tavazza M, Ilardi V. Hairpin RNA-mediated silencing of *Plum pox virus* P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus, Transgenic Res 14 (2005) 989-994.
- [4] Lennfors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, van Roggen P, Tuveesson S, Valkonen JPT and Gielen J. dsRNA-mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), Mol Breed 18 (2006) 313-325.
- [5] Abhary MK, Anfoka GH, Nakhla MK, Maxwell DP, Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the *Tomato yellow leaf curl virus* complex, Arch Virol 151 (2006) 2349-2363.
- [6] Hamilton JH, Baulcombe DC, A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants, Science 286 (1999) 950-952.
- [7] Baulcombe D, RNA silencing, Trends Biochem Sci 30 (2005) 290-293.



- [8] Helliwell CA, Waterhouse PM, Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants, *Methods* 30 (2003) 289-295.
- [9] Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM, Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature* 407 (2000) 319-320.
- [10] Goelet P, Lomonosoff GP, Butler PJ, Akam ME, Gait MJ, Karn J, Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA, *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (19) (1982) 5818-5822.
- [11] Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillok ET, Sit TL, Lommel SA, The multifunctional capsid proteins of plant RNA virus, *Annu Rev Phytopathol* 39 (2001) 419-460.
- [12] Edwardson JR, Christie RG, CRC Handbook of viruses infecting legumes. CRC press, Boca Raton, Fla, Cucumoviruses (1991) 293-319.
- [13] Roossinck M, *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution, *Mol Plant Pathol* 2 (2001) 59-63.
- [14] Chappel TM, Beaudoin AL, Kennedy GG, Interacting virus abundance and transmission intensity underlie tomato spotted wilt virus incidence: an example weather-based model for cultivated tobacco, *PLoS One* 8(8) (2013) e73321.
- [15] Srinivasan B, Riley D, Diffie S, Shrestha A, Culbreath A, Winter Weeds as Inoculum Sources of Tomato Spotted Wilt Virus and as Reservoirs for Its Vector, *Frankliniella fusca* (Thysanoptera:Thripidae) in Farmscapes of Georgia, *Environ. Entomol.* 43(2) (2014) 410-420.
- [16] Pico B, Díez MJ, Nuez F, Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. "The Tomato yellow leaf curl virus"- a review, *Sci Hortic* 67 (1996) 151-196.
- [17] Chowda RV, Colvin J, Muniyapa V, Seal S, Diversity and distribution of *begomoviruses* infecting tomato in India, *Arch Virol* 150 (2005) 845-867.
- [18] Ha C, Coombs S, Reville P, Harding R, Vu M, Dale J, Molecular characterization of *Begomoviruses* and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World Geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation, *J Gen Virol* 89 (2008) 313-326.
- [19] Idris AM, Brown JK, Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan, *Arch Virol* 150 (2005) 1003-1012.
- [20] Kormelink R, de Haan P, Peters D, Goldbach R, Viral RNA synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants, *Journal of General Virology* (73) (1992) 687-693.
- [21] Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, Mori M, Kaido M, Mise K, Tsuda S, Okuno T, Identification of a novel RNA suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus, *FEBS Letters* 532 (2002) 75-79.
- [22] Chu Hoàng Hà, Phạm Thị Vân, Lê Trần Bình, Cây trồng chuyên gen kháng bệnh virus bằng kỹ thuật RNAi. Hội nghị Quốc gia về Sinh vật biến đổi gen và Quản lý an toàn sinh học. Hà Nội, 28/08/2009, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ (2009) 19-28.
- [23] Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, Cây thuốc lá chuyên gen mang cấu trúc RNAi kháng đồng thời hai loại virus gây bệnh khảm, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(2) (2009) 241-249.
- [24] Nguyễn Hải Yến, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình, Tạo dòng cà chua PT18 kháng bệnh xoăn vàng lá do virus bằng kỹ thuật RNAi, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 9(3) (2011) 333-340.
- [25] Karimi M, Inzé D, Depicker A, GATEWAY<sup>TM</sup> vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Trends Plant Sci* 7(2002) 193-195.
- [26] Topping JF, Tobacco transformation. In Foster GD, Taylor SC (ed.), *Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance*, vol. 81. Humana Press, Totowa, NJ (1998) 365-485.
- [27] Herbers K, Meuwly P, Wolf B, Metraux JP, Sonnewald U, Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway, *Plant Cell* 8 (1996) 793-803.

## Multi-fragment Transgenic *Nicotiana tabacum* Plants Exhibit Broad Spectrum Resistance to Multiple Viruses (TMV, CMV, TYLCV and TSWV) Based on RNAi

Lê Thị Thủy<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Hiền<sup>2</sup>,  
Phạm Thị Vân<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi National University of Education, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

**Abstract:** RNA interference (RNAi) is a widely used method to develop broad spectrum viral resistance in transgenic tobacco plants in order to significantly reduce yield losses caused by viruses. Therefore, in this study we have designed pGWTCYS binary vector carrying RNAi construct with inverted repeat multi-fragment TCYS flanked by an intron. This multi-fragment TCYS carries partially functional genes of four harmful tobacco viruses in Vietnam which are TMV (*Tobacco mosaic virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) and TSWV (*Tomato spotted wilt virus*). This construct had been transformed into *Nicotiana tabacum* K326 and C9-1 via *Agrobacterium tumefaciens*. After regeneration and selection procedure, 66 transgenic tobacco lines growing well on selective media were obtained (36 of K326 and 30 of C9-1 transgenic tobacco lines). PCR analysis showed that all the lines were positive with TCYS transgene. The resistant valuation to all 4 studied viruses of T0 transgenic tobacco lines revealed that 20/66 lines did not show pathological expression after viral infection.

**Keywords:** *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato spotted wilt virus*, tobacco, RNA interference.