CƠ CHẾ KHÁNG VI RÚT GÂY BỆNH HẠI TRÊN CÂY TRỒNG

Đặng Minh Tâm[1], Roger Mitchell[2], Neena Mitter[2]

TÓM TẮT

Cơ chế kháng vi rút thông qua vai trò của small interference RNA (siRNA) thể hiện quan trọng trong sinh học phân tử suốt 20 năm qua. Các sợi đôi RNA từ 21 đến 24 nucleotides được tạo nên bởi enzyme gọi là Dicer làm thoái hóa các RNA có cùng chuỗi mã tương tự và tạo nên tính kháng vi rút ở thực vật. Nghiên cứu này giúp xác định rõ vai trò của các siRNA trong cơ chế kháng vi rút gây hại thông qua vi ghép sử dụng các cây chuyển gen kháng lại vi rút CMV (Cucumber mosaic virus) trên cây thuốc lá để đưa ra cơ chế kháng vi rút gây hại chung trên cây trồng. Kết quả cho thấy 21 và 22 nucleotides siRNA là nguyên nhân chính tạo nên tính kháng vi rút trong cơ chế kháng vi rút gây hại ở thực vật.

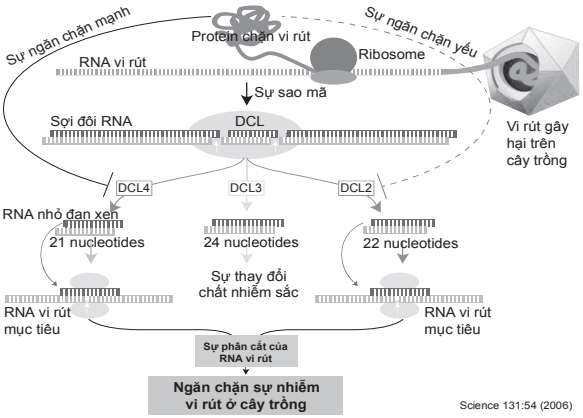
Từ khóa: Vi rút, siRNA, vi ghép, 21 và 22 nucleotides

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Có nhiều cơ chế khác nhau trong tính kháng vi rút gây hại ở cây trồng. Trong đó vai trò của siRNA (small interference RNA) là rất quan trọng trong cơ chế kháng lại vi rút gây bệnh. Trong nghiên cứu này tập trung chủ yếu vào vai trò của siRNA (từ 21 đến 24 nucleotides) trên cây trồng thông qua quan sát và ứng dụng phương pháp vi ghép *(Micro-grafting)* chuyển gen kháng từ gốc lên ngọn ở cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum).*

Sự im lặng của RNA lần đầu tiên được khám phá ở thực vật khi hai phòng thí nghiệm độc lập khác nhau báo cáo rằng sự biểu hiện quá mức của chalcone synthase trên cây petunia làm cho cả hai gen "chalcone synthase" chuyển gen và nội sinh đều im lặng (Napoli và *ctv*., 1990; Van der Krol và *ctv*., 1990). Đó được gọi là sự im lặng của gen sau phiên mã hay post transcriptional gene silencing (PTGS).

Sự im lặng của RNA (RNA silencing) là cơ chế giám sát có tính bảo tồn ở các loài có nhân được cho là đóng vai trò trong việc bảo vệ chống lại sự lan tỏa của các axít nhân như là virút, sự chuyển gen và tế bào chất. Con đường dẫn tới sự im lặng của RNA ở thực vật, động vật và nấm có sự giống nhau về mặt di truyền và đặc điểm sinh hóa. Chìa khóa cho đặc điểm duy trì này là nó được tạo ra bởi sợi đôi RNA (dsRNA) và các sợi đôi này sẽ thành lập nên những sợi RNA trung gian nhỏ hay siRNA từ 21 đến 24 nucleotides (21-24 nt) thông qua hoạt động của men RNase III like enzyme được gọi là Dicer. Các phân tử siRNA này sau đó được gắn vào một phức hợp gây ra sự im lặng của RNA gọi là RNA-induced silencing complex (RISC) và chắc chắn dẫn đến sự thoái hóa của bất kỳ RNA nào có chuỗi mã tương tự với sợi đôi RNA (dsRNA) ban đầu tạo ra nó theo Braden M. Roth và *ctv.*, 2004. Cơ chế kháng lại vi rút gây hại ở thực vật này được mô tả như trong Hình 1. Thí nghiệm nhằm thiết lập mối liên hệ giữa sự hiện diện của siRNA trên *Nicotiana tabacum* với tính kháng lại vi rút CMV thông qua vi ghép. Từ đó, đưa ra cơ chế chung cho tính kháng vi rút ở thực vật.



Hình 1. Cơ chế bảo vệ kháng lại vi rút gây hại ở thực vật

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Các cây được chuyển gen

Thế hệ T1 của các cây được chuyển gen Wild type *Nicotiana tabacum* (W38) có mang gen 2b (gen kháng) được thiết kế với dạng kiến trúc hình kẹp tóc (hairpin construct). Các dòng mang gen 2bihp kháng lại với CMV gồm có hai dòng: 2bihp (19) và 2bihp (44). Dòng mang gen 2bihp nhiễm với CMV gồm có dòng 2bihp (1). Dòng Wide type W38 được dùng như là cây đối chứng không chuyển gen.

2.2. Vi ghép để tìm ra sự vận chuyển của gen kháng

Hạt được cấy trong đĩa petri. Sau khoảng 7 ngày khi cây đã được 2 lá mầm sẽ được đem đi cắt và ghép trên giấy màng (membrane). Phần ngọn ghép gồm có cây đối chứng W38 (không chuyển gen) và cây

[1] Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long
[2] Trường Đại học Queensland, Brisbane, Úc.

mang gen kháng (2b) nhưng không biểu hiện (2bihp (1)). Phần gốc ghép là các cây mang gen kháng (2b) thể hiện tính kháng (2bihp (19) và 2bihp (44).

2.3. Ly trích RNA

Các mẫu lá được thu cho việc ly trích RNA tiến hành sau khi các cây ghép đã được chủng bệnh với CMV triệu chứng bệnh được ghi nhận 2 và 4 tuần sau khi chủng bệnh.

RNA tổng số được ly trích với Trizol® và sự thể hiện của nó được xác định trên 1% agarose gels. Các RNAs có trọng lượng phân tử nhỏ được phân lập từ RNA tổng số bằng phương pháp kết tủa PEG, chất lượng của siRNA cũng được xác định trên 1% agarose gels.

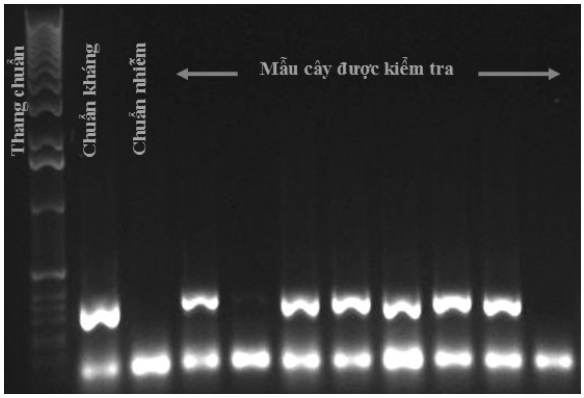
2.4. Phân tích siRNA thông qua phương pháp Northern Blot

Các RNA có trọng lượng phân tử nhỏ được ly trích và chạy điện di trên 17% polyacrylamide gel với 7M urea thông qua điện di đứng và chuyển RNA sang màng nylon bằng máy Bio-Rad semi-dry transfer unit. RNA được chuyển sang màng nylon và được tự chụp bằng tia phóng xạ bằng cách đánh dấu với ^{32}P trên gen 2b bằng đoạn dò RNA chuyên biệt. Điều này được khẳng định qua việc kiểm tra lại trên cùng mẫu với đoạn dò chuyên biệt của U6 (Ubiquitin).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phản ứng PCR để kiểm tra trên cây chuyển gen

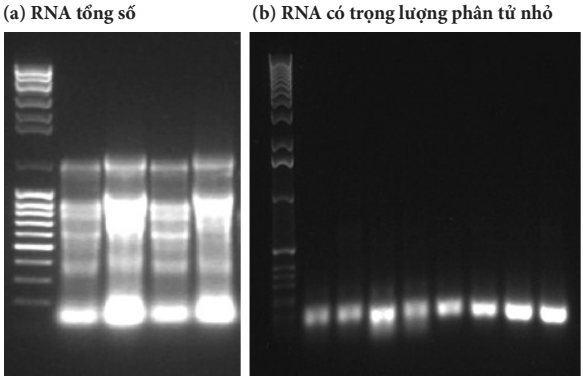
Các cây ghép trước tiên được kiểm tra cho sự hiện diện của gen 2b bằng phản ứng PCR với đoạn mồi chuyên biệt của nó. Chỉ có những cây thể hiện băng tách biệt ở 330bp trên bảng điện di (Hình 2) thể hiện có sự chuyển gen mới được sử dụng tiếp theo trong thí nghiệm và được chủng với vi rút CMV.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR xác định sự hiện diện của gen kháng 2b từ kết quả chuyển gen ở vị trí 330bp

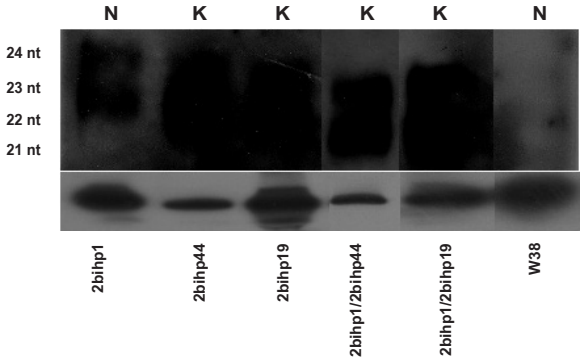
3.2. Ly trích RNA tổng số và RNA có trọng lượng phân tử nhỏ

Các RNA được ly trích trước khi sử lý với vi rút CMV để kiểm tra chất lượng và số lượng của RNA tổng số dựa vào kết quả điện di trên 1% agarose gel. Kết quả cho thấy có sự hiện diện của cả RNA có trọng lượng phân tử nhỏ và lớn như trong Hình 3(a) và RNA có trọng lượng phân tử nhỏ trong Hình 3(b).



Hình 3. Đánh giá chất lượng (a) RNA tổng số và (b) RNA có trọng lượng phân tử nhỏ được điện di trên 1% agarose gel

3.3. Phân tích Northern Blot của siRNA



Hình 4. Phân tích Northern Blot trên sự biểu hiện của gen 2bihp1, các dòng bố mẹ và các dòng vi ghép của 2bihp1 (2bihp1/2bihp44 and 2bihp1/2bihp19) so sánh với dòng Wide Type W38 và đoạn dò của U6 làm đối chứng

Ghi chú: N là kiểu hình nhiễm và K là kiểu hình kháng, nt là nucleotides.

Kết quả cho thấy sự biểu hiện của gen kháng 2b trên các dòng kháng 2bihp44, 2bihp19, 2bihp1/2bihp44 và 2bihp1/2bihp19 đều có sự hiện diện của siRNA ở 21 và 22 nucleotides. Điều này đã chứng minh được tính kháng vi rút gây hại trên cây trồng phụ thuộc vào sự xuất hiện của 21 và 22 nucleotides siRNA và

tương thích với đánh giá kiểu hình kháng. Kết quả đã góp phần giải thích được cơ chế kháng vi rút gây bệnh hại trên cây trồng thông qua vai trò của 21 và 22 nucleotides siRNA.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

siRNA có thể vận chuyển từ phần gốc lên phần chồi thông qua quá trình vi ghép.

Tính kháng vi rút phụ thuộc vào sự hiện diện của 21 và 22 nucleotides siRNA trong cây.

Xác định được cơ chế kháng lại vi rút gây hại trên cây trồng là do 21 và 22 nucleotides siRNA trong cây qui định.

4.2. Đề nghị

Ứng dụng cơ chế trên để tạo ra 21 và 22 nucleotides siRNA kháng lại vi rút gây bệnh hại trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Braden, M.R., G.J. Pruss, V.B. Vance, 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research,* 102: 97-108.

Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K.D. Kasschau, J.C. Carrington and O. Voinnet, 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science,* 313: 68-71.

Napoli, C., C. Lemieux, R. Jorgensen, 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.

Van der Krol, A.R., L.A. Mur, M. Beld, J.N.M. Mol, A. Stuitie, 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.

Virus resistance mechanism on plant

Dang Minh Tam, Roger Mitchell, Neena Mitter

Abstract

Virus resistance mechanism by small interference RNA (siRNA) studying is the most important thing to happen in molecular biology during the last 20 years. The double stranded RNA from 21 to 24 nucleotides is processed by the activity of an RNase III like enzyme called Dicer and specifically degrades any RNA sharing sequence similarity with the inducing dsRNA causing virus resistance in plant. This study helped in clearly identifying the role of siRNA in virus resistance mechanism by using micro grafting in transgenic plant against CMV (Cucumber mosaic virus) in tobacco to retrieve a general virus resistance mechanism in plant. The result showed that 21 and 22 nucleotides siRNA are the major factors proceeding virus resistance in its mechanism in plant.

Key words: Virus, siRNA, micro grafting, 21 and 22 nucleotides

Ngày nhận bài: 12/7/2016
Ngày phản biện: 19/7/2016
Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh
Ngày duyệt đăng: 26/7/2016

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA GIÁ THỂ TRỒNG CÂY ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA CÂY ĐINH LĂNG LÁ NHỎ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) TRONG ĐIỀU KIỆN MẶN NHÂN TẠO

Nguyễn Thị Thanh Hải[1], Ninh Thị Phíp[1],
Bùi Thế Khuynh[1], Nguyễn Phương Mai[2], Vũ Thị Hoài[3]

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành trong năm 2015 ở điều kiện nhà lưới nhằm đánh giá ảnh hưởng của giá thể trồng cây đến sinh trưởng, phát triển của cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) trong điều kiện mặn nhân tạo ở nồng độ NaCl 3‰. Thí nghiệm gồm 8 công thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Bổ sung chế phẩm AMF, phân vi sinh Sông Gianh và rơm rạ mục trong các công thức thí nghiệm. Giá thể trồng có ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và tính chịu mặn của cây đinh lăng. Sử dụng giá thể rơm + AMF giúp cây sinh trưởng,

[1] Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2] Sinh viên lớp K57CTTT, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[3] Công ty TNHH MTV Đầu tư phát triển và dịch vụ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam