

## KHẢO SÁT KHÁNG THỂ KHÁNG *Mycoplasma hyopneumoniae* TRÊN LỢN NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH NAM TRUNG BỘ VÀ TÂY NGUYÊN

Đặng Văn Tuấn<sup>1</sup>, Lê Đình Hải<sup>1</sup>, Vũ Khắc Hùng<sup>1</sup>, Võ Thành Thìn<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Sử dụng phương pháp ELISA để khảo sát tình hình nhiễm vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) trên đàn lợn nuôi tại một số tỉnh khu vực Nam Trung bộ và Tây Nguyên. Có tất cả 601 mẫu huyết thanh lợn được thu thập tại các tỉnh Khánh Hòa, Kon Tum, Bình Định và Đắk Lắk để kiểm tra kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* bằng bộ Kit ELISA của hãng IDEXX Herdchek (Mỹ). Kết quả cho thấy, tỷ lệ lợn nhiễm *M. hyopneumoniae* trung bình tại các tỉnh khảo sát là 38,1%. Mẫu huyết thanh lợn thịt có tỷ lệ dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* là 69,56%, lợn nái 52,17%, lợn con theo mẹ và lợn con sau cai sữa lần lượt là 3,57% và 0,82%. Lợn nuôi theo phương thức công nghiệp có tỷ lệ mẫu dương tính với *M. hyopneumoniae* là 74,34%, cao hơn nhiều so với lợn nuôi nhỏ lẻ ở hộ gia đình (46,32%). Ngoài ra, kết quả khảo sát cũng cho thấy, mẫu huyết thanh thu thập trong mùa khô có tỷ lệ dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* cao hơn mẫu thu thập trong mùa mưa.

**Từ khóa:** Lợn, *M. hyopneumoniae*, kháng thể, ELISA

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*M. hyopneumoniae* từ lâu đã được xác định là tác nhân gây ra bệnh viêm phổi ở lợn. Triệu chứng lâm sàng đặc trưng của bệnh là ho khô, ho kéo dài (Sibila *et al.*, 2009). Trên thực địa, triệu chứng ho rất khác nhau, ho nhiều hoặc ít và có thể không có triệu chứng ho ở một số lợn nhiễm bệnh (Maes *et al.*, 2008). Lợn bị viêm phổi do *M. hyopneumoniae* không có sự khác nhau đáng kể trong tiêu thụ thức ăn, thân nhiệt so với lợn khỏe mạnh (Escobar *et al.*, 2007). Các triệu chứng lâm sàng như giảm tính thèm ăn, thờ dốt hoặc kiệt sức, chết... là do các tác nhân gây bệnh thứ phát như vi khuẩn tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*), cúm lợn (swine influenza) hay vi-rút gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRSV) (Thacker *et al.*, 2001, Sorensen *et al.*, 1997). Lợn mắc bệnh qua khỏi hoặc mắc bệnh ở thể mạn tính có thể sinh kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trong huyết thanh. Thiệt hại về kinh tế do *M. hyopneumoniae* gây ra thường khó tính toán bởi vì bệnh thường có sự tham gia của các tác nhân khác. Bệnh làm giảm khả năng tăng trọng, giảm hiệu suất chuyển hóa thức ăn, tăng chi phí điều trị bệnh (Clark *et al.*, 1991).

Khảo sát, đánh giá tình trạng nhiễm bệnh trên diện rộng là rất cần thiết trong giai đoạn chăn nuôi lợn phát triển như hiện nay ở nước ta. Tuy nhiên, việc nuôi cấy, phân lập *M. hyopneumoniae* từ mẫu bệnh phẩm là cực kỳ khó khăn và hầu như không thành công. Vì vậy, trong nghiên cứu này sử dụng phương pháp ELISA để khảo sát kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trong mẫu huyết thanh lợn nuôi tại một số tỉnh Nam trung bộ và Tây Nguyên. Kết quả này là cơ sở để đánh giá sự lưu hành của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* trong đàn lợn.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu huyết thanh lợn lấy tại các trang trại và hộ gia đình các tỉnh Khánh Hòa, Kontum, Bình Định, Đắk Lắk.

- Kit ELISA phát hiện kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* hãng IDEXX (Mỹ).

- Các dụng cụ, thiết bị phòng thí nghiệm để thực hiện phản ứng ELISA như micropipet, máy rửa và máy đọc ELISA

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Lấy mẫu huyết thanh: Đối với lợn nuôi công nghiệp, mỗi trại lợn thịt quy mô 500 - 1000 con lấy không quá 10 mẫu. Trại quy mô 100 - 500 nái lấy 5 - 10 mẫu huyết thanh lợn nái và không quá 10 mẫu huyết thanh lợn con. Đối với lợn nuôi tại các hộ gia đình, ở mỗi tỉnh chọn 3 huyện, mỗi huyện chọn 2-3 xã có nhiều hộ chăn nuôi heo để lấy mẫu. Mỗi hộ gia đình lấy 3 - 5 mẫu áp dụng cho tất cả các đối tượng lợn.

Dùng bơm tiêm vô trùng lấy 2-3 ml máu từ tĩnh mạch cổ của lợn. Sau đó chiết lấy huyết thanh cho vào ống eppendorf và bảo quản -20°C đến khi sử dụng. Tất cả lợn lấy mẫu huyết thanh được chọn ngẫu nhiên và không tiêm vắc-xin phòng bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae*.

- Thực hiện phản ứng ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất KIT với mẫu huyết thanh được pha loãng 1/40. Đọc kết quả bằng phần mềm KC junior ở bước sóng 650. Giá trị S/P được tính như sau:

$S/P = (OD_{mẫu} - OD_{đối chứng âm}) / (OD_{đối chứng dương} - OD_{đối chứng âm})$

Mẫu huyết thanh dương tính khi giá trị S/P  $\geq 0,4$ .

<sup>1</sup> Phân viện Thú y miền Trung

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*

Để khảo sát kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trong mẫu huyết thanh lợn nuôi tại một số tỉnh Nam trung bộ và Tây Nguyên, đã tiến hành lấy mẫu huyết thanh lợn và kiểm tra kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*. Kết quả được trình bày bảng 1.

**Bảng 1.** Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*

TT	Địa điểm	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Bình Định	144	67	46,52
2	Khánh Hòa	150	57	38,00
3	Kon Tum	155	54	34,83
4	Đắk Lắk	152	51	33,55
Tổng		601	229	38,1

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong 601 mẫu huyết thanh xét nghiệm có 229 mẫu dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*, chiếm tỷ lệ 38,1%. Trong đó, cao nhất là mẫu huyết thanh lợn ở Bình Định (46,52%), tiếp theo là Khánh Hòa (38%), Kon Tum (34,83%) và Đắk Lắk (33,55%). Toàn bộ mẫu huyết thanh được lấy từ lợn chưa tiêm vắc-xin *M. hyopneumoniae*. Theo một khảo sát được tiến hành tại miền Bắc thì tỷ lệ lợn nghi nhiễm *M. hyopneumoniae* dao động từ 19,92% đến 21,16% (Lê Văn Lành *ctv.*, 2012). Tỷ lệ này thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu này của chúng tôi. Khảo sát của Lê Văn Lành có thể đã không phản ánh đúng thực trạng lợn nhiễm bệnh bởi vì chỉ dựa vào các triệu chứng lâm sàng và biểu hiện bệnh tích của một số lợn được mổ khám. Trong khi đó, trên thực tế rất nhiều lợn mang trùng nhưng không thể hiện bất cứ triệu chứng nào của bệnh hoặc triệu chứng không rõ ràng.

#### 3.2. Kết quả phát hiện kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trên các nhóm lợn

Bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae* gây ra thường diễn biến rất khác nhau ở các lứa tuổi của lợn. Để hiểu rõ hơn về tỷ lệ mang trùng trên lợn cũng như có cơ sở để xuất thời điểm tiêm vắc-xin thích hợp, đã tiến hành phân tích tỷ lệ mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* theo các nhóm lợn. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2.** Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* theo nhóm lợn

TT	Nhóm lợn	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Theo mẹ (< 3 tuần tuổi)	112	4	3,57
2	Sau cai sữa (3 – 6 tuần tuổi)	121	1	0,82
3	Lợn thịt	184	128	69,56
4	Lợn nái	184	96	52,17

Tỷ lệ các mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trên các nhóm lợn khác nhau. Lợn thịt có tỷ lệ mẫu dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* cao nhất (69,56%), tiếp theo là lợn nái (52,17%), lợn theo mẹ (3,57%) và thấp nhất là lợn con sau cai sữa (0,82%).

Kết quả nghiên cứu phù hợp với nhận định của nhiều tác giả trong và ngoài nước đã công bố. Đối với lợn thịt, tỷ lệ mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* giao động từ 54 - 100% tùy thuộc vào quy mô trang trại, phương thức chăn nuôi và các quốc gia khác nhau (Maes *et al.*, 1998; Rautiainen *et al.*, 2000). Ở lợn nái, tỷ lệ mẫu huyết thanh dương tính cũng giao động khoảng 50 – 60% tùy thuộc vào thời điểm và địa điểm nghiên cứu (Grosse Beilage *et al.*, 2009). Ở lợn con theo mẹ và lợn con cai sữa, lượng kháng thể có trong máu chủ yếu là do lợn mẹ truyền sang. Tuy nhiên, khả năng truyền kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* của lợn mẹ qua sữa cho lợn con là rất yếu (Nguyễn Thị Phước Ninh *et al.*, 2008; Bandrick *et al.*, 2014). Do đó, cần sử dụng vắc-xin sớm cho lợn con, có thể trước 3 tuần tuổi. Điều này cũng phù hợp với khuyến cáo của nhiều hãng sản xuất vắc-xin phòng bệnh do *M. hyopneumoniae* gây ra trên lợn, thời điểm sử dụng vắc-xin thích hợp nhất cho lợn con là lúc 2 tuần tuổi và nhắc lại lúc 4 tuần tuổi.

#### 3.3. Kết quả phát hiện kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trên lợn theo phương thức chăn nuôi

Quy mô và mật độ đàn lợn được xem là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ mắc bệnh viêm phổi ở lợn. Có mối tương quan thuận giữa tăng quy mô đàn và tỷ lệ nhiễm *M. hyopneumoniae* trong đàn lợn. Các thử nghiệm lâm sàng cũng cho thấy nguy cơ lây nhiễm *M. hyopneumoniae* phụ thuộc rất lớn vào điều kiện môi trường chăn nuôi và phương thức

chăn nuôi. Trong nghiên cứu này, phân tích kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trong mẫu huyết thanh lợn được lấy 2 phương thức chăn nuôi chủ yếu tại địa phương là nuôi công nghiệp (trang trại) và hộ gia đình. Do tỷ lệ mẫu huyết thanh dương tính ở nhóm lợn con theo mẹ và lợn cai sữa rất thấp (5/233 mẫu) nên chúng tôi tập trung phân tích trên số mẫu lợn nái và lợn thịt (Bảng 3).

**Bảng 3.** Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* theo phương thức chăn nuôi

TT	Phương thức chăn nuôi	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Công nghiệp	191	142	74,34
2	Hộ gia đình	177	82	46,32

Kết quả bảng 3 cho thấy tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn nuôi theo phương thức công nghiệp dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* cao hơn so với nuôi hộ gia đình. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều này chứng tỏ sự lưu hành của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* trong các trại chăn nuôi là rất lớn. Phương thức chăn nuôi theo hộ gia đình có tỷ lệ nhiễm vi khuẩn thấp có thể là do quy mô đàn nhỏ và mật độ chăn nuôi thấp và đặc biệt là các hộ chăn nuôi thường phân bố thưa thớt nên đã hạn chế được rất nhiều sự truyền lây mầm bệnh. Ngược lại, với quy mô nuôi lợn công nghiệp, điều kiện chuồng trại khép kín, quy mô đàn lớn và mật độ chăn nuôi cao, tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn *M. hyopneumoniae* gây bệnh và truyền lây trong đàn

Kết quả này phù hợp với nhận định của Stark (2000). Theo các tác giả, quy mô và mật độ đàn lợn được xem là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ lợn mắc bệnh viêm phổi ở lợn. Có mối tương quan thuận giữa tăng quy mô đàn và tỷ lệ nhiễm *M. hyopneumoniae* trong đàn lợn. Nguy cơ lây nhiễm *M. hyopneumoniae* trong các cơ sở chăn nuôi công nghiệp theo kiểu dòng chảy từ lợn nái → lợn con → lợn thịt (continuous flow of pig) sẽ cao hơn so với các cơ sở chăn nuôi chuyên canh cùng vào – cùng ra (All-in/ All-out) và hộ gia đình.

### 3.4. Kết quả phát hiện kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trên lợn theo mùa vụ

Điều kiện thời tiết là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự lây lan mầm bệnh trong các cơ sở chăn nuôi. Trong nghiên cứu này, mẫu huyết thanh được thu thập tại hai thời điểm là mùa mưa và mùa khô. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 4.

Kết quả bảng 4 cho thấy tỷ lệ dương tính ở mẫu huyết thanh lợn thu thập vào mùa khô cao hơn mùa mưa ( $p < 0,05$ ). Mùa khô ở khu vực Nam trung bộ và Tây nguyên thường kéo dài và xuất hiện những cơn mưa bất chợt làm cho nhiệt độ thay đổi đột ngột. Điều này làm suy giảm sức đề kháng của lợn, tạo điều kiện cho vi khuẩn *M. hyopneumoniae* xâm nhập.

**Bảng 4.** Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể *M. hyopneumoniae* theo mùa vụ

TT	Mùa vụ	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Mưa	175	92	52,57
2	Khô	193	132	68,39

## IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trung bình là 38,1%. Trong đó tỷ lệ mẫu dương tính cao nhất là ở lợn thịt (69,56%), tiếp theo là lợn nái (52,17%) và lợn theo mẹ (3,57%) và lợn sau cai sữa (0,82%).

Tỷ lệ mẫu huyết thanh lợn dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* phụ thuộc vào phương thức chăn nuôi và điều kiện thời tiết.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Văn Lành, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Trịnh Đình Thâu, Đặng Hữu Anh, Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Bá Hiên, 2012. Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh suyễn lợn và ứng dụng kỹ thuật semi-nested PCR xác định *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, XIX (2): 13-20.
- Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Bạch Tuyết, 2008. Kháng thể mẹ truyền chống *Mycoplasma hyopneumoniae* và tăng trưởng ở heo con từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 15(1): 26-32
- Bandrick, M., Theis, K., and Molitor, T.W., 2014. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *BMC Veterinary Research*, 10:124.
- Clark, L., Armstrong, C., Freeman, M., Scheidt, A., Sands-Freeman, L. & Knox, K., 1991. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary medicine (USA)*.
- Escobar, J., Van Alstine, W. G., Baker, D. H. & Johnson, R. W., 2007. Behaviour of pigs with viral and bacterial pneumonia. *Applied Animal Behaviour Science*, 105, 42-50.

- Grosse Beilage, E., Rohde, N., Krieter, J., 2009.** Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Prev. Vet. Med.*, 88, 255-263.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B., de, K.A., 1998.** The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. *Zentralbl. Veterinarmed.*, B 45, 495-505
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. & Haesebrouck, F., 2008.** Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 126, 297-309.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F. & Segales, J., 2009.** Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*, 181, 221-231.
- Sorensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E. & Pedersen, M. W., 1997.** *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology*, 54, 23-34.
- Stark, K., 2000.** Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine - A literature review. *Vet. J.*, 159, 37-56.
- Rautiainen, E., Virtala, A.M., Wallgren, P., Saloniemi, H., 2000.** Varying effects of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different multisource fattening pig herds. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 47, 461-469.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J. & Janke, B. H., 2001.** Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2525-2530.

## Survey of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs raising in Southern Central and Western Highland provinces

Dang Van Tuan, Le Dinh Hai, Vu Khac Hung, Vo Thanh Thin

### Abstract

ELISA method was used for investigation of *M. hyopneumoniae* infection in pigs raising in some Southern Central and Western Highland provinces of Vietnam. A total of 601 serum samples were collected from pigs in Khanh Hoa, Kon Tum, Binh Dinh and Dak Lak provinces for detecting antibody against *M. hyopneumoniae* by using Kit ELISA *M. hyopneumoniae* IDEXX Herdchek (USA). The result showed that on average of 38.1% were positive with *M. hyopneumoniae* antibodies. 69.56% samples of fattening pigs were positive with *M. hyopneumoniae* antibodies. The ratio of sow's positive serum samples with *M. hyopneumoniae* antibodies was 52.17% and that of weaning and post weaning piglets were 3.57% and 0.82%, respectively. 74.34% of pigs raised by industrial method were positive with *M. hyopneumoniae* antibodies and this figure was significantly higher than that of pigs raised in households (46.32% positive). In addition, the survey revealed that the rate of positive samples with *M. hyopneumoniae* antibodies in dry season was significantly higher than that in rainy season.

**Key words:** Pigs, *M. hyopneumoniae*, antibodies, ELISA

Ngày nhận bài: 17/7/2016

Người phản biện: TS. Chung Anh Dũng

Ngày phản biện: 19/7/2016

Ngày duyệt đăng: 26/7/2016

# CƠ CHẾ KHÁNG VI RÚT GÂY BỆNH HẠI TRÊN CÂY TRỒNG

Đặng Minh Tâm<sup>1</sup>, Roger Mitchell<sup>2</sup>, Neena Mitter<sup>2</sup>

## 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

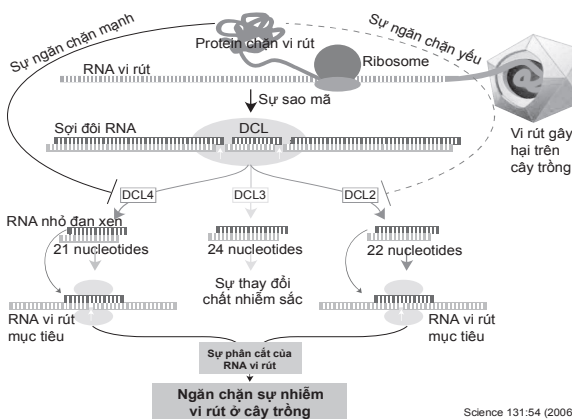
## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

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 axit 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. Chia 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 2bhp kháng lại với CMV gồm có hai dòng: 2bhp (19) và 2bhp (44). Dòng mang gen 2bhp nhiễm với CMV gồm có dòng 2bhp (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

<sup>1</sup> Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

<sup>2</sup> Trường Đại học Queensland, Brisbane, Úc.