TẠO CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN MANG CẤU TRÚC RNAi CHỨA GEN MÃ HÓA PROTEIN VỎ CỦA VIRUS GÂY BỆNH XOĂN VÀNG LÁ CÀ CHUA

Nguyễn Thị Hải Yến[1*], Chu Hoàng Mậu[2], Lê Trần Bình[3]
[1]*Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên*
[2]*Đại học Thái Nguyên,* [3]*Viện Công nghệ Sinh học*

TÓM TẮT

Hiện nay, công nghệ RNAi trong việc tạo cây trồng kháng virus đang là hướng nghiên cứu khả quan và nhận được sự quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Trong nghiên cứu này, cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi mang gen CP mã hóa protein vỏ của TYLCV được thiết kế có dạng RNA kẹp tóc tự bổ sung mang intron (intron-hairpin RNA, ihpRNA) nằm giữa hai đoạn gen cần chuyển dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S đã được sử dụng để chuyển vào thuốc lá *Nicotiana tabacum* giống K326. Kết quả lây nhiễm cho 101 mảnh lá với vi khuẩn mang cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi trong 3 lô thí nghiệm, sau các giai đoạn nuôi cấy và chọn lọc thu được 187 dòng thuốc lá T_0 sống sót và ra rễ trên môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/l. Lựa chọn ngẫu nhiên 21 dòng cây chuyển gen trong nhà lưới để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được 18 dòng dương tính. Các dòng thuốc lá mang gen chuyển đều cho kết quả dương tính với phản ứng RT-PCR kiểm tra sự biểu hiện gen thông qua RNA.

Từ khóa: *Chuyển gen, thuốc lá, RNAi, virus xoăn vàng lá cà chua.*

MỞ ĐẦU

Virus xoăn vàng lá cà chua TYLCV là nguyên nhân gây bệnh xoăn vàng lá trên các cây trồng họ cà như cà chua, thuốc lá, khoai tây… làm thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng cây trồng. Năng suất thiệt hại trung bình từ 55 - 90% thậm chí là 100%.

TYLCV được lan truyền nhờ loài bọ phấn *Bemisia tabaci*, đây là loài côn trùng có sức sinh sản nhanh và mạnh nên bệnh lây lan nhanh chóng và gây thiệt hại nghiêm trọng đến mùa màng. Bên cạnh các biện pháp kiểm soát như phun thuốc trừ côn trùng, tìm kiếm nguồn gen kháng virus tự nhiên, chuyển gen có nguồn gốc virus gây bệnh, thì hiện nay RNAi là cơ chế gây bất hoạt gen đang được chú ý nghiên cứu ứng dụng. RNAi được khởi đầu bằng việc phân cắt phân tử RNA chuỗi kép (dsRNA) bởi enzyme Dicer tạo thành các phân tử siRNA ức chế nhỏ có kích thước khoảng 21-26 nucleotide [3]. Sau đó, các siRNA này được giải xoắn và một mạch gắn kết với một phức hợp đa protein (RISC) một cách chọn lọc tạo thành phức hợp cảm ứng sự bất hoạt RNA. Sau khi nhận dạng mRNA đích qua việc bắt cặp các base tương đồng với trình tự của sợi đơn siRNA trong RISC, mRNA đích bị phân cắt nhờ một endonuclease và làm bất hoạt gen [5]. 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 mà chứa trình tự tương đồng với gen đích [9], [7], [12].

Trong hệ gen của *Begomovirus*, gen CP mã hóa protein vỏ (coat protein) tham gia cấu tạo capside là gen có chức năng quan trọng trong quá trình nhân lên của virus, mặt khác còn được xem là những vùng gen có độ bảo thủ cao nên thường được lựa chọn làm nguyên liệu trong việc thiết kế vector chuyển gen tạo cây kháng virus gây bệnh ở thực vật [1], [13]. Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả chuyển cấu trúc vector RNAi/pK7WGTLCV-CPi mang gen CP mã hóa protein vỏ của TYLCV được thiết kế có dạng RNA kẹp tóc tự bổ sung mang intron (intron-hairpin RNA, ihpRNA) nằm giữa hai đoạn gen cần chuyển dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S vào giống *Nicotiana tabacum* K326 nhằm kiểm tra sự biểu hiện của cấu trúc RNAi trong cây mô hình để từ đó có những thử nghiệm trên đối tượng cây trồng đang bị gây thiệt hại bởi loại virus này.

[*] *Tel: 0982 982291*

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vật liệu thực vật

Cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 *in vitro* được nuôi giữ trong phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Viện công nghệ Sinh học.

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CV58 PGV2260 mang cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi do Nguyễn Thị Hải Yến và cộng sự thiết kế [2].

Phương pháp nghiên cứu

Chuyển cấu trúc RNAi mang gen của TYLCV vào thuốc lá Nicotiana tabacum K326

Để chuyển cấu trúc RNAi vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326, chúng tôi sử dụng quy trình chuyển gen của Topping có cải tiến [10].

+ Tạo dịch huyền phù vi khuẩn

Trước khi biến nạp cấu trúc RNAi vào thuốc lá một ngày, tiến hành nuôi lắc một khuẩn lạc vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 pGV2260 mang cấu trúc RNAi trong 3 ml LB lỏng bổ sung streptomycin 40 mg/l, spectinomycin 100 mg/l và rifamycin 50 mg/l trong khoảng thời gian 7 – 8 giờ ở 28°C với tốc độ 200 v/phút. Sau đó hút 1 ml dịch khuẩn vừa nuôi sang 15 ml LB bổ sung kháng sinh như trên, tiến hành nuôi lắc qua đêm cho đến khi OD_{660} = 0,7 – 1,0. Tiếp theo, hút 4 – 5 ml dịch khuẩn trên vào 30 ml LB lỏng không bổ sung kháng sinh, nuôi lắc đến OD_{660} = 0,7 – 1,0. Dịch khuẩn được ly tâm 6000 v/p trong 10 phút để thu tế bào vi khuẩn. Cặn khuẩn được hòa trong dung dịch ½ MS (OD_{660} = 0,5 – 0,7).

+ Chuẩn bị vật liệu và biến nạp

Lá thuốc lá *in vitro* được gây tổn thương bằng lưỡi dao cắt bốn cạnh xung quanh, đặt lên môi trường GM (*MS bổ sung 1 mg/l BAP, 30 g/l sucrose và 7,5 g aga, pH = 5,8*) trong 2 ngày. Sau 2 ngày nuôi cảm ứng, các mảnh thuốc lá được gắp ra và ngâm vào dịch huyền phù vi khuẩn trên trong khoảng thời gian 10 phút. Tiếp đó, các mảnh lá được thấm khô và chuyển lên môi trường đồng GM có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim 400 mg/l và kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l. Sau 3 – 4 tuần, các cụm chồi hình thành được cắt chuyển sang môi trường GM có bổ sung cefotaxim 400 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Các chồi cao 2 – 3 cm được cắt chuyển sang môi trường ra rễ RM ((*MS bổ sung 0,1 mg/l IBA, 35 g/l sucrose và 7,5 g aga, pH = 5,8*) có bổ sung cefotaxim 250 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Những cây ra rễ trên môi trường chọn lọc sẽ được nhân vô tính trên môi trường RM bổ sung cefotaxim 250 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Các cây con thế hệ T_0 sau 2 tuần trên môi trường ra rễ sẽ được trồng ra bầu trấu : cát = 1 : 1 và sau 7 – 10 ngày chuyển sang bầu đất hoặc đem trồng trong vườn thí nghiệm.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen

Những dòng thuốc lá chuyển gen được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển và hoạt động của gen chuyển ở mức độ phiên mã sử dụng để PCR và RT-PCR

Phương pháp PCR nhân gen CPi: Thu lá thuốc lá ở giai đoạn cây trồng trong vườn thí nghiệm sau 3 tuần tuổi. Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB có cải tiến (Collins, Symons, 1992) [5]. Mẫu lá cà chua được nghiền nhanh trong nitrogen lỏng, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 giờ. Dùng chloroform: isoamylalchohol (24 : 1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Gen đặc hiệu được khuếch đại với cặp mồi dùng trong thiết kế vector chuyển gen. Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12 µl H_2O; 2 µl đệm 10x; 2 µl $MgCl_2$ 25 mM, 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,8 µl mồi 10 pmol mỗi loại; 3 µl DNA tổng số và 0,4 µl *Taq* DNA polymerase. Phản ứng được tiến hành trong máy PCR với chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ (94°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút); kết thúc ở 72°C/10 phút.

Phương pháp RT-PCR kiểm tra biểu hiện gen CPi trong cây chuyển gen: RNA tổng số từ lá thuốc lá được tách chiết theo Trizol Reagent (Invitrogen) và làm khuôn tổng hợp cDNA (Fermentas). Sản phẩm cDNA được sử

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn

dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR nhân gen chuyển bằng cặp mồi đặc hiệu (Primer-Fi và Primer-Ri) và đồng thời cũng được sử dụng cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của virus trong cây bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen virus.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi

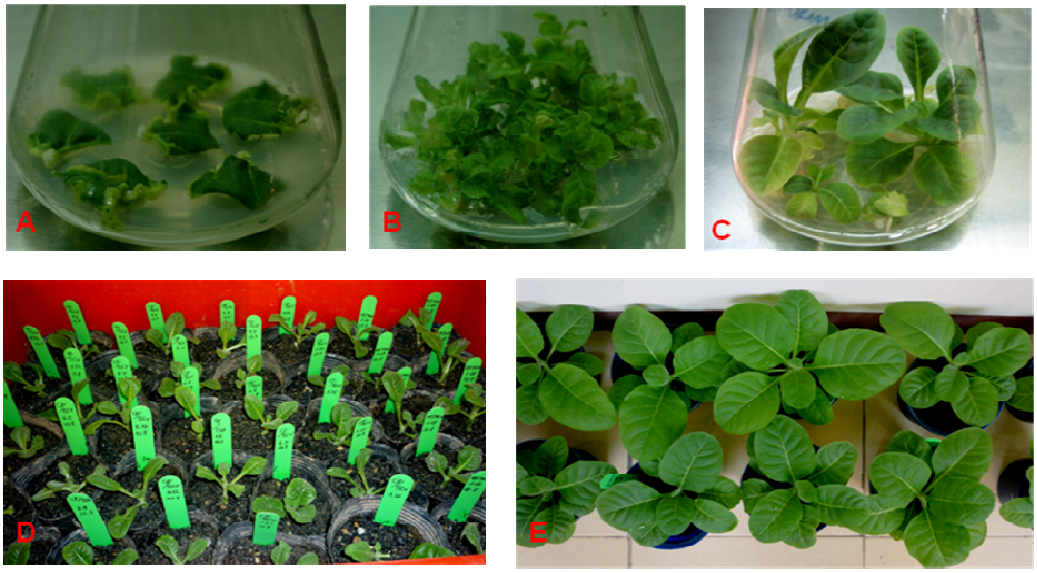
Để kiểm tra hoạt động của cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi trong cây, chúng tôi thử nghiệm chuyển cấu trúc này vào cây thuốc lá, một trong những cây mô hình cho chuyển gen.

Với tổng số 101 mảnh lá lây nhiễm vi khuẩn mang cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi trong 3 lô thí nghiệm, sau các giai đoạn nuôi cấy và chọn lọc thu được 187 dòng thuốc lá T_0 sống sót và ra rễ trên môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh kamamycin 50 mg/l (Bảng 1). Các dòng thuốc lá chuyển gen được nhân vô tính để đảm bảo số lượng cấy cần thiết cho phục vụ phân tích sàng lọc PCR, RT-PCR và đánh giá khả năng kháng virus. Cây con T_0 trên môi trường ra rễ sau 10 ngày được ra bầu trấu cát. Sau đó, tiếp tục chọn ngẫu nhiên 50 dòng thuốc lá T_0 để ra bầu trấu pha cát và bầu đất. Kết quả thu được 48 cây sống sót. Các dòng thuốc lá ra bầu đất có tỷ lệ sống sót là 100%.

Bảng 1. *Kết quả biến nạp cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CPi vào thuốc lá K326*

Cấu trúc chuyển	Lô thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số cụm chồi hình thành	Số chồi sống sót /GM+Km50	Số cây ra rễ /RM + Km50
RNAi/pK7WG TLCV-CPi	1	30	50	98	65
	2	37	48	71	44
	3	34	57	93	78
	Tổng số	**101**	**155**	**262**	**187**
WT	1	30	0	-	-
	2	30	55*	120*	114*

Ghi chú: GM – môi trường tái sinh; RM – môi trường ra rễ; nồng độ kanamycin là 50 mg/l; WT – cây wild-type dạng dại; (*)-Môi trường không có kháng sinh chọn lọc kanamycin.



Hình 1. *Một số hình ảnh chuyển gen vào thuốc lá*
A. Mảnh lá trên môi trường tái sinh sau 1 tuần; B. Chồi tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy; C. Cây con trên môi trường chọn lọc Kanamycin 50 mg/l; D. Cây con trong bầu trấu cát; E. Cây chuyển gen trong bầu đất sau 2 tuần

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn

Bảng 2. *Kết quả ra cây và kiểm tra cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc RNAi*

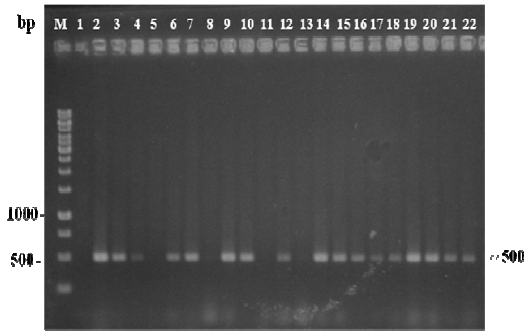
Cấu trúc chuyển	Số cây ra bầu trấu cát	Số cây ra bầu đất	Kiểm tra PCR		RT-PCR	
			Số cây kiểm tra	Số cây dương tính	Số cây kiểm tra	Số cây dương tính
RNAi/pK7WGT LCV-CPi	50	48	21	18	18	18
WT	10	10	1	0	1	0

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen

Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen

DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu lá thuốc lá có tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 – 2,0 đảm bảo chất lượng cho phản ứng nhân gen tiếp theo. Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi dùng trong thiết kế vector để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cần chuyển trong một số dòng thuốc lá kháng Km đã trồng ở nhà lưới được lựa chọn ngẫu nhiên. Kết quả điện di cho thấy có 4 dòng (số 5,8,11,13) không thu được băng sản phẩm PCR, các dòng còn lại đều nhận được một băng duy nhất với kích thước khoảng 500 bp phù hợp với kích thước của đoạn gen CPi đã được thiết kế trong cấu trúc RNAi/pK7WGTLCV-CP (đoạn gen thiết kế có chiều dài 489 bp). Những dòng không cho băng vạch mong muốn mặc dù vẫn sống sót và ra rễ môi trường chọn lọc bổ sung kanamycin 50 mg/l có thể giải thích do sự đứt gãy gen trong vector tái tổ hợp do đó các dòng cây chuyển gen này chỉ mang gen kháng kháng sinh hoặc mang một phần gen đích, dẫn đến cặp mồi nhân gen không bám được vào để thực hiện phản ứng PCR. Trong chuyển gen, việc mất gen đích và sắp xếp lại gen trong T-DNA sau khi được chuyển vào tế bào cây chủ có thể xảy ra và đã được tìm thấy trong thực nghiệm.

Như vậy, cấu trúc RNAi mang đoạn gen CPi mã hóa protein vỏ của TYLCV đã được chuyển thành công vào thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326. Do đó, các thí nghiệm trong phân tích cây chuyển gen cần phải tiến hành để kiểm tra sự biểu hiện gen trong cây chuyển gen.



Hình 2. *Hình ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen CPi trong các dòng thuốc lá chuyển gen.* ***M****: Marker 1kb;* ***(1)****: Cây WT;* ***(2 - 22)****: các dòng thuốc lá chuyển gen.*

Kết quả RT-PCR kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển qua mRNA trong các dòng thuốc lá chuyển gen

Nghiên cứu biểu hiện của gen chuyển là rất cần thiết vì đây chính là mục đích của chuyển gen, nếu gen được đưa vào genome mà không được biểu hiện thì coi như không có giá trị. Biểu hiện gen trong sinh học phân tử là quá trình hoạt động của gen để tạo ra sản phẩm cuối cùng là protein. Quá trình biểu hiện gen được thể hiện qua hai giai đoạn: (1) Phiên mã từ DNA sang RNA và (2) Dịch mã từ RNA tổng hợp các phân tử protein thông qua bộ máy ribosome. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng RT-PCR để kiểm tra sự biểu hiện gen thông qua RNA. Kết quả thực hiện phản ứng RT-PCR tương ứng của các dòng dương tính với PCR ở trên cho 100 % dòng thuốc lá mang gen chuyển đều được phiên mã ra RNA (Bảng 2). Tuy nhiên, cấu trúc gen chúng tôi thiết kế theo mô hình RNAi, nên sau khi mRNA được tạo thành thì sẽ tạo dạng kẹp tóc và kích hoạt cơ chế RNAi và phân hủy RNA thành các phân tử siRNA, vì vậy

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn

việc phát hiện mRNA chỉ là bước khởi đầu để xác định biểu hiện gen. Để có kết quả chính xác hơn cần phải tiến hành lai siRNA và đánh giá khả năng kháng virus của các dòng cây chuyển gen.

Hiện nay, ứng dụng các phân tử RNA nhỏ để ngăn chặn biểu hiện gen thông qua cơ chế câm gen RNAi đang là hướng nghiên cứu triển vọng nhằm tạo ra các loại cây trồng kháng virus. Hiệu quả kháng virus bằng kỹ thuật RNAi ở thực vật lần đầu tiên được chứng minh với công trình của Waterhouse và cộng sự (1998) khi sử dụng gen mã hóa protein xử lý sau dịch mã HC-pro của virus Y khoai tây để kháng lại chính virus này [12]. Ngay sau đó kỹ thuật này đã được ứng dụng và tạo ra nhiều giống cây trồng kháng virus [1], [6], [11]. Năm 2000, Smith và đồng tác giả đã nhận thấy cấu trúc kẹp tóc hpRNA có đoạn intron (ihpRNA) nằm giữa hai đoạn lặp lại đảo chiều có hiệu quả bất hoạt gen sau phiên mã ở những cây chuyển gen lên đến 100%, trong khi cấu trúc hpRNA không có intron chỉ cho hiệu quả tương ứng là 69% [9]. Sau này, nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh tính hiệu quả cao của cấu trúc ihpRNA có nguồn gốc gen virus gây bệnh đối với việc tạo cây chuyển gen kháng lại chính virus đó [4]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, cấu trúc RNAi mang gen mã hóa protein vỏ của TYLCV đã được sử dụng để chuyển thành công vào cây mô hình thuốc lá, kết quả kiểm tra hoạt động biểu hiện gen chuyển qua RNA đã cho thấy cấu trúc hoạt động tốt trong các dòng cây chuyển gen. Kết quả này là tiền đề để chúng tôi thực hiện các thí nghiệm tiếp theo nhằm tạo cây trồng kháng với TYLCV như cà chua, khoai tây…

KẾT LUẬN

Cấu trúc RNAi mang gen mã hóa protein vỏ của virus gây bệnh xoăn vàng lá cà chua (RNAi/pK7WGTLCV-Cpi) đã được chuyển thành công vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* K326 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens.*

Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen ở các dòng được chọn ngẫu nhiên bằng cặp mồi đặc hiệu cho 21 dòng thu được 18 dòng dương tính. Kiểm tra biểu hiện gen thông qua RNA bằng phản ứng RT-PCR cho thấy gen chuyển trong cây chuyển gen đều được biểu hiện qua RNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Phạm Thị Vân, Nguyễn Văn Bắc, Lê văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2008) Tạo cây thuốc lá kháng bệnh virus khảm dưa chuột bằng kỹ thuật RNAi. *Tạp chí công nghệ sinh học* 6 (4A): 679 – 687.

[2]. Nguyễn Thị Hải Yến**,** Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình (2009) Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi có khả năng kháng virus gây bệnh xoăn lá cà chua. *Báo cáo hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2009*: 473 – 477.

[3]. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 295-296.

[4]. Bonfim K, Faria JC, Nogueira OPL, Mendes EA, Aragao FJL (2007) RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (Phaseolus vulgaris). *Mol Plant Microbe Interact* 20: 717–726.

[5]. Collins GG and Symons RH (1992) Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Mol Biol Rept* 10: 233-235.

[6]. Hamilton JH, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.

[7]. Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 826–833.

[8]. Kunik T, Salomon R, Zamir D, Navot N, Zeidan M, Michelson I, Gafni Y, Czosnek H (1994) Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio Tech* 12: 500-504.

[9]. Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M, Tsagris M (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to Potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol Breed* 14: 185–197.

[10]. Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG and Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319–320.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn

[11]. Topping JF (1998) Tobacco transformation. In Foster GD, Taylor SC, Plant virology protocol, vol 81: 365-485
[12]. Wang MB, Abbott DC and Waterhouse PM (2000) A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol* 1:347–356.
[13]. Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13959–13964.
[14]. Zrachya A, Kumar PP, Ramakrishna U, Levy Y, Loyter A, Arazi T, Lapidot M, Gafni Y (2007) Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. *Transgenic Res*.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF TABACCO K326 PLANTS CARRYING RNAi STRUCTURE CONTAINING A CP GENE OF TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS

Nguyen Thi Hai Yen[1*], Chu Hoang Mau[2], Le Tran Binh[3]
[1]College of Science – TNU
[2]Thai Nguyen University,[3]Institute of Biotechnology

Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) is one of the main causes to decrease productivity and quality of solaniacease. The most effective method to prevent TYLCV is the use of resistant varieties. Recently, RNAi technology is a new trend in creating virus-resistant plants at many laboratories. We obtained some significant achievements by generating these kinds of plant. In this report, the RNAi/pK7WGTLCV-CPi construct containing Vietnam TYLCV CP genes under controlling of CaMV35S was transformed into tabaccum plants (cv. K326) via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. 101 pieces of leave were infected with *A. tumefaciens* carrying this transgene structure. After regeneration and selection we obtained 187 lines of transgenic plants resistant to 50 mg/l kanamycin. Analyse the presence of transgenes in kanamycine-resistant plants by PCR with specific primers, we obtained 18/21 positive lines. These transgenic tabaccum are positive with RT-PCR analyse to test gene expression.
Key words: *Transformation, tabaccom, RNAi, tomato yellow leaf curl virus*

Ngày nhận bài: 10/6/2012, ngày phản biện: 11/6/2012, ngày duyệt đăng:27/7/2012

[*] *Tel: 0982 982291*

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên http://www.lrc-tnu.edu.vn