

THIẾT KẾ VECTOR MANG miRNA NHÂN TẠO ỨC CHẾ ĐẶC HIỆU SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN MPG1 Ở NẤM ĐẠO ÔN (*MAGNAPORTHE GRISEA*) GÂY BỆNH TRÊN LÚA

Nguyễn Thị Phương Thảo^{1*}, Nguyễn Trảng Hiếu¹, Phan Thị Hương², Nguyễn Thị Thùy Linh¹

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

² Trung tâm Khảo nghiệm khuyến nông khuyến ngư Thái Bình

Email*: ntpthao@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 17.09.2013

Ngày chấp nhận: 26.09.2013

TÓM TẮT

Ở những quốc gia có điều kiện khí hậu nóng ẩm, chẳng hạn như Việt Nam, bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe grisea* gây thiệt hại đặc biệt nghiêm trọng trên lúa. Gen *MPG1* liên quan tới quá trình hình thành vôi áp, quá trình phát triển triệu chứng bệnh và hình thành bào tử. Do vậy việc ức chế biểu hiện của gen này có thể khiến nấm không gây được bệnh trên lúa. Nghiên cứu đã tiến hành nhân dòng một đoạn mang thông tin mã hóa của gen *MPG1* trên 4 mẫu nấm đạo ôn tại Việt Nam và kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen *MPG1* có tính đồng nhất đạt 99,3-100% trên các mẫu nấm nghiên cứu cũng như mẫu đối chứng (Guy-11, mã số trên genbank: L20685.2). 2 trình tự miRNA nhân tạo được thiết kế sử dụng khung miRNA-319a của *Arabidopsis thaliana* nhằm ức chế đặc hiệu gen *MPG1* ở nấm đạo ôn. Các miRNA nhân tạo này đã được cài vào vector biểu hiện ở thực vật pPS1 để tạo cấu trúc chuyển gen vào cây lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả chuyển cấu trúc pre-amiR-P1 vào giống lúa J02 đã thu được 18 dòng lúa chuyển gen, các dòng lúa chuyển gen này thích nghi và sống sót trong điều kiện nhà lưới.

Từ khóa: Gen *MPG1*, lúa chuyển gen, miRNA, nấm đạo ôn (*Magnaporthe grisea*).

Construction of Vector Containing Artificial miRNA to Specifically Inhibit *MPG1* Gene Expression in *Magnaporthe grisea* Causing Rice Blast

ABSTRACT

In hot and humid climate countries, such as Vietnam, *Magnaporthe grisea* causes serious damage to rice. *MPG1*, a pathogenicity gene of *Magnaporthe grisea* is related to the process of aspersorium formation, symptom development and sporulation. Therefore, inhibition of *MPG1* gene expression probably results in reduced or loss of pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. A coding fragment of *MPG1* gene of 4 rice blast fungus isolates was cloned and the sequencing results showed that the values of gene identity ranged from 99.3-100% among isolates in comparison with the control strain (Guy-11, ID genbank: L20685.2). Two artificial miRNAs were designed using natural *Arabidopsis thaliana* miRNA-319a backbone to specifically inhibit *MPG1* gene expression. These artificial miRNAs were ligated into plant expression pPS1 vector to create gene construct for transferring into rice plant via *Agrobacterium tumefaciens*. 18 lines of transgenic rice variety J02 were identified to carry pre-amiR-P1 and these lines showed adaptation and survival under the greenhouse condition.

Keywords: *MPG1* gene, miRNA, *Magnaporthe grisea*, transgenic rice.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn lúa gây ra bởi nấm *Magnaporthe grisea*, mỗi năm làm thế giới mất một lượng lúa gạo đủ để nuôi sống 60 triệu người (Scardaci et al., 2003). Việt Nam với đặc điểm khí hậu nóng ẩm, mưa nhiều là điều kiện

thuận lợi cho bệnh đạo ôn phát triển, đặc biệt là trong vụ đông - xuân. Trong những năm gần đây, bệnh đạo ôn liên tục gây hại nghiêm trọng trên cả hai miền Nam và Bắc. Trong chiến lược phòng chống bệnh đạo ôn, việc tìm ra các gen kháng nhằm tạo ra các giống lúa mang gen kháng vẫn được coi là phương pháp có hiệu quả

và bền vững. Với hướng tiếp cận này, khoảng hơn 30 gen kháng bệnh đạo ôn đã được phát hiện (Jia et al., 2000; Orbach et al., 2000; Tabien et al., 2000; Liu et al., 2003; Huang et al., 2008; Ramkumar et al., 2010), tạo cơ sở cho việc chọn tạo giống mang gen kháng bệnh. Ở Việt Nam, do đặc điểm gây hại của bệnh đạo ôn, các nghiên cứu trong phòng chống bệnh đạo ôn cũng nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Trong đó, việc đánh giá đa dạng nguồn gen kháng và tạo ra các giống lúa mang gen kháng bệnh đạo ôn nhận được sự quan tâm hơn cả (Nguyễn Mạnh Cường và cs., 2004; Lê Cẩm Loan và cs., 2006; Nguyễn Hoàng Lộc và cs., 2008; Phan Hữu Tôn, 2004). Tuy nhiên, chủng nấm đạo ôn rất đa dạng và dễ phát sinh chủng mới, trong khi đó, mỗi gen kháng chỉ có khả năng chống được một số chủng nhất định, bởi vậy các nhà khoa học luôn phải nỗ lực tìm ra gen kháng mới để chống lại các chủng mới phát sinh.

RNAi nói chung hay miRNA nói riêng là công cụ để điều hoà sự biểu hiện các gen đơn hoặc các nhóm gen khác nhau trên cơ sở các trình tự đặc hiệu. RNAi có thể sử dụng để “làm câm” sự biểu hiện của bất kỳ gen nào. Năm 2003, Kadotani et al. (2003) đã mô tả hiện tượng câm gen ở nấm *M. grisea* gây bệnh đạo ôn khi nó được chuyển cấu trúc RNAi. Việc chuyển trực tiếp cấu trúc RNAi vào tế bào nấm gây ra hiện tượng “câm gen” rất có ý nghĩa trong các nghiên cứu thực hiện trong phòng thí nghiệm, chẳng hạn như nghiên cứu hoạt động của RNAi trong tế bào nấm, nhưng đường hướng này khó khăn cho việc áp dụng RNAi trong chiến lược phòng chống bệnh ở cây trồng. Trước vấn đề này, một số tác giả đã tiến hành chuyển các cấu trúc RNAi đặc hiệu cho các gen gây bệnh của nấm vào cây để tạo nên cây chuyển gen có tính kháng đối với nấm gây bệnh. Trong trường hợp này, các RNA nhỏ (small RNAs) ở bên ngoài thành tế bào của nấm cũng có thể được tế bào nấm hấp thu và gây ra ức chế sự biểu hiện của gen mục tiêu ở nấm gây bệnh, kết quả này đã được kiểm chứng bằng các thí nghiệm *in vitro* (Van de Craen et al., 2006) cũng như *in vivo* (Roberts et al., 2008). Việc tạo cây lúa chuyển gen kháng bệnh đạo ôn cũng đã được tiếp cận

theo hướng này bởi Valent et al., 2006; Van De Craen et al., 2010 và cho kết quả bước đầu rất khả quan. Những kết quả trên cho thấy có thể ứng dụng công nghệ RNAi để tạo ra giống lúa chống bệnh đạo ôn bằng cách ức chế trực tiếp các gen quan trọng liên quan tới khả năng gây bệnh của nấm. Việc sử dụng trình tự bảo thủ của nấm *M. grisea* để thiết kế vector RNAi có khả năng tạo ra được giống lúa chuyển gen có tính kháng phổ rộng hơn đối với các chủng nấm *M. grisea* hoặc thậm chí là các loài nấm thuộc chi *Magnaporthe* khác nhau.

Gen *MPG1* (có mã số trên genbank: L20685.2) là một gen liên quan tới tính gây bệnh được biểu hiện trong suốt quá trình hình thành vôi áp, quá trình phát triển triệu chứng bệnh và hình thành bào tử. Gen *MPG1* mã hóa cho một protein nhỏ thuộc họ hydrophobins được tiết ra ngoài màng tế bào của bào tử. Protein MPG1 rất cần thiết cho việc phát triển cấu trúc lây nhiễm, tham gia tương tác với các thành phần kị nước trên bề mặt lá lúa và hoạt động như một thụ thể để kích thích sự hình thành vôi áp (Talbot et al., 1996). Như vậy, *MPG1* đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành và phát triển bệnh đạo ôn ở lúa. Việc ức chế sự biểu hiện của *MPG1* có thể khiến nấm đạo ôn không gây được bệnh. Nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết kế miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu gen *MPG1* của *M. grisea* và chuyển cấu trúc miRNA nhân tạo này vào lúa nhằm phục vụ chiến lược phát triển giống lúa có khả năng kháng được các chủng nấm đạo ôn khác nhau ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Bốn mẫu nấm đạo ôn phân lập (kí hiệu: 15, 54, 67, 70) được cung cấp bởi Nguyễn Văn Viên, bộ môn Bệnh cây – Nông dược, khoa Nông học, trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội. Mẫu số 15 được phân lập từ giống lúa nếp ở Ninh Giang, Hải Dương; mẫu số 54 được phân lập từ giống lúa Khang Dân ở Nam Trực, Nam Định; mẫu số 67 được phân lập từ giống lúa Q5 ở Nam Phong, Nam Định; mẫu số 70 được phân lập từ giống lúa C70 ở Hữu Lũng, Lạng Sơn.

Các plasmid: pJET1.2/blunt, pRS300, pPS1. Vi khuẩn: *Escherichia coli* TOP10, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Hạt lúa *Oryza sativa* Japonica giống J02 (Viện nghiên cứu phát triển cây trồng, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội). Thông tin trình tự gen *MPG1* trên ngân hàng gen thế giới, mã số L20685.2.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nhân dòng gen

DNA tổng số của các mẫu nấm đạo ôn phân lập được tách chiết theo quy trình của Talbot et al. (1993). Một đoạn mang thông tin mã hóa gen *MPG1* được khuếch đại bằng PCR trên 4 mẫu đạo ôn. Phản ứng được thực hiện với thể tích 50 μ l với thành phần phản ứng là 50ng DNA, 0,2 μ M mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu, 0,2mM mỗi loại dNTP, 2mM MgSO₄, *Pfu* buffer và 1,25U *Pfu* DNA polymerase (EP0502, Fermentas), với chu kỳ nhiệt: giai đoạn biến tính ban đầu 95°C trong 3 phút, 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 2 phút (35 chu kỳ), chu kỳ kết thúc bằng 72°C trong 7 phút, sản phẩm được giữ ở 4°C trong máy PCR (Mastercycler proS - Eppendorf). Cặp mỗi sử dụng để nhân đoạn gen này là MPG1 R:5'-CTGCTCGCCGGAGCAGCACG-3' và MPG1 F:5'-TCCCAAATGCTCACCATAGC-3' (Irie et al., 2003). Các sản phẩm đoạn gen mục tiêu được khuếch đại bằng PCR được nhân dòng trong vi khuẩn *E.coli* TOP10 sử dụng vector nhân dòng pJET1.2/blunt. Các bước nhân dòng trong vi khuẩn được thực hiện theo quy trình của kit CloneJET PCR Cloning (K1231, hãng Fermentas). Các đoạn gen sau khi chuyển vào vector nhân dòng được giải trình tự nhằm chọn lọc được các vector có mang đoạn gen mục tiêu không bị đột biến trong quá trình làm PCR sử dụng mỗi pJET1.2 forward sequencing primer 5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3' hoặc pJET1.2 forward sequencing primer 5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3' (Macrogen Inc., Hàn Quốc).

2.2.2. Thiết kế và nhân dòng miRNA nhân tạo

Thông tin của các trình tự của các đoạn gen mục tiêu được sử dụng để thiết kế miRNA nhân

tạo sử dụng công cụ Designer trên phần mềm trực tuyến WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Từ danh sách các miRNA nhân tạo ứng viên được đưa ra bởi WMD3, lựa chọn miRNA nhân tạo thích hợp theo các tiêu chí được đưa ra bởi Schwarz et al. (2003), Schwab et al. (2005); Warthmann et al. (2008). Năng lượng liên kết giữa trình tự miRNA nhân tạo ứng viên với sợi mRNA mục tiêu được tính toán sử dụng phần mềm RNAup trong bộ công cụ Vienna RNA package phiên bản 2.0.0 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAup.cgi>). Trình tự miRNA nhân tạo và đoạn mRNA có kích thước khoảng 80bp có chứa trình tự bắt cặp bổ sung với miRNA nhân tạo được đưa vào phần mềm RNAup để tính toán năng lượng bắt cặp tự do hiệu quả bằng tổng của năng lượng thu được do sự bắt cặp của miRNA nhân tạo với mRNA (ΔG_{int}), năng lượng cần thiết để phá vỡ cấu trúc bậc 2 của miRNA nhân tạo (ΔG_{u_s}) và năng lượng cần thiết để mở vị trí bắt cặp trên mRNA (ΔG_{u_v}). Sau khi lựa chọn được miRNA nhân tạo phù hợp, trình tự miRNA nhân tạo được đưa vào công cụ Oligo trên WMD3 để thiết kế mỗi nhân dòng miRNA nhân tạo sử dụng khung vector pRS300 mang *ath-mi319a precursor* của *Arabidopsis thaliana*. Với mỗi trình tự miRNA nhân tạo, WMD3 sẽ đưa ra 4 trình tự oligonucleotide (từ I đến IV), các trình tự này được sử dụng để đưa nhân dòng miRNA nhân tạo bằng cách vào thay thế trình tự *ath-mi319a* nội sinh trong khung bằng trình tự miRNA nhân tạo. Plasmid pRS300 chứa trình tự *ath-mi319a precursor* được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR để nhân dòng pre-miRNA theo chiến lược được mô tả bởi Schwab (2006).

2.2.3. Thiết kế vector biểu hiện ở thực vật mang cấu trúc miRNA nhân tạo

Vector pPSI và đoạn trình tự mang pre-miRNA cùng được xử lý bằng enzyme giới hạn *XhoI* (FD0694, Fermentas) và *XbaI* (FD0684, Fermentas). Vector pPSI và đoạn trình tự mang pre-miRNA nhân tạo đã được xử lý bằng enzyme giới hạn được ghép nối với nhau để tạo vector tái tổ hợp sử dụng enzyme T4 DNA ligase

Thiết kế vector mang miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen *MPG1* ở nấm đạo ôn (*Magnaporthe grisea*) gây bệnh trên lúa

(EL0014, Fermentas). Plasmid tái tổ hợp được kí hiệu là pPSI-pre-amiR được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng TOP10 theo phương pháp sốc nhiệt (Seidman et al., 1997). Dịch vi khuẩn biến nạp được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (LB+ 50 mg/l kanamycin + 150 mg/l rifampicin + 50 mg/l streptomycin). Kết quả biến nạp được kiểm tra bằng PCR khuếch đại, sử dụng cặp mồi đặc hiệu oligo III và mồi ngược là mồi trên plasmid có trình tự: pPSI-3417-3440-R: 5'-AGGTACGTGGAGTGTCTTAGGTGA-3'. Trình tự pre-miRNA nhân tạo sau khi cài vào vector pPSI được khẳng định bằng phương pháp giải trình tự (Macrogen Inc., Hàn Quốc) sử dụng mồi pPSI-3417-3440-R có trình tự là: 5'-AGGTACGTGGAGTGTCTTAGGTGA-3'. Các pPSI-pre-amiR sau khi được khẳng định về trình tự được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 để chuyển miRNA nhân tạo vào cây lúa.

2.2.4. Chuyển miRNA nhân tạo vào cây lúa

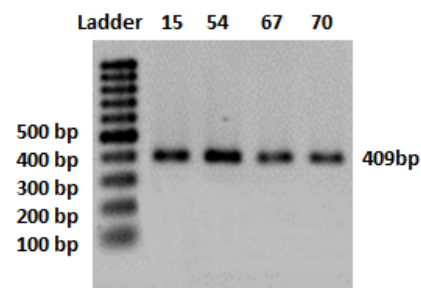
Giống lúa J02 (japonica) được tiến hành chuyển gen theo quy trình của Rahman et al., 2011; Ozawa, 2008 cải biến, được chọn lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh kanamycin. Các cây tái sinh được tiến hành kiểm tra sự có mặt của promoter 2x35S sử dụng cặp mồi 35S-F1 5'-CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC-3', 35S-R1 5'-ATATAGAGGAAGGGTCTTGCGAAGG-3' và miRNA precursor sử dụng cặp mồi II miR-P1-a và III miR*-P1-s trên khuôn DNA đã được tách chiết theo quy trình CTAB cải tiến của Shahzadi et al.(2010).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

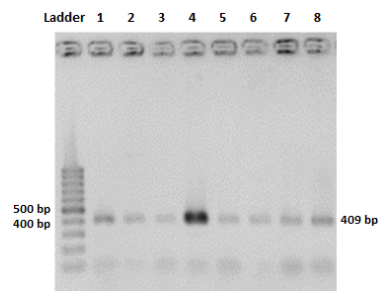
3.1. Nhân dòng gen *MPG1*

Kết quả nhân dòng đoạn gen mục tiêu bằng PCR sử dụng DNA khuôn là DNA tổng số của các mẫu nấm đạo ôn đã được tinh sạch được thể hiện như trên hình 1. Kết quả cho thấy sản phẩm được nhân lên có kích thước tương ứng với kích thước mục tiêu (409 bp). Kết quả nhân

dòng trong vi khuẩn *E.coli* TOP10 sử dụng vector pJET1.2/blunt cũng cho thấy đã tạo được các vector tái tổ hợp mang đoạn gen *MPG1* của 04 mẫu nấm (Hình 2). Các vector nhân dòng có mang đoạn gen mục tiêu sau đó được đọc trình tự và trình tự các gen này được đăng kí trên ngân hàng gen thế giới với mã số KF648283, KF648284, KF648285, KF648286. Tính đồng nhất về trình tự DNA của các đoạn gen *MPG1* trên các mẫu nấm đạo ôn nghiên cứu và đoạn gen đối chứng được xác định bằng sử dụng phần mềm ClustalW. Kết quả cho thấy các trình tự đồng nhất 99,3-100% (Bảng 1). Sự sai khác chỉ xảy ra ở ba nucleotide cuối cùng đầu 3' của các đoạn trình tự. Như vậy, đoạn gen nhân lên có tính bảo thủ rất cao trên các mẫu nấm đạo ôn khác nhau và trình tự đoạn gen này có thể được sử dụng để thiết kế miRNA nhân tạo ức chế gen *MPG1* đặc hiệu trên các mẫu nấm khác nhau.



Hình 1. Kết quả PCR gen *MPG1* trên 4 mẫu nấm đạo ôn



Hình 2. Kết quả PCR kiểm tra gen *MPG1* trong *E. coli* TOP10

Bảng 1. Tính đồng nhất trình tự DNA của đoạn gen *MPG1* trên 4 mẫu nấm đạo ôn nghiên cứu và trình tự đối chứng sử dụng phần mềm ClustalW

	L20685.2	MPG1_15	MPG1_54	MPG1_67	MPG1_70
L20685.2	ID	99,8	99,3	100	100
MPG1_15		ID	99,3	99,8	99,8
MPG1_54			ID	99,3	99,3
MPG1_67				ID	100
MPG1_70					ID

Ghi chú: ID đồng nhất 100%

Bảng 2. Danh sách các miRNA nhân tạo ứng viên cho gen *MPG1*

WMD3 Results

http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Designer;rm=show_results;id=21104

Targets: mpg				
miRNA nhân tạo	Perfect match hybridization energy (kcal/mole)	target gene Id	Hybridization energy	
TACGAAACGGTGTCCGAGCAG	-48,08	mpg	-48,08	
TGGGAGTCTAAAGAGTGGCTA	-46,85	mpg	-46,85	
TAGACGACCTTCTCGGCACCG	-50,91	mpg	-50,91	
TACCTTCTCGGCACCGCACTT	-49,48	mpg	-49,48	
TGTGAGCATTGTTGGGACTGCTC	-48,29	mpg	-48,29	
TTTCTCGGCACCGCACTTCTG	-48,55	mpg	-48,55	
TATGGAGACGGAAGGACCCTC	-50,67	mpg	-50,67	
TAGACGGAAGGACCCTCACCA	-50,99	mpg	-50,99	
TGGAGACGGAAGGACCCTCAC	-52,76	mpg	-52,76	
TCATGGAGACGGAAGGACCCT	-51,06	mpg	-51,06	
TGTCGATGGGGATCTCGGCAC	-52,39	mpg	-52,39	
TTTGTGATGGGGATGAGCTG	-45,65	mpg	-45,65	
TCGATGGGGATCTCGGCACCA	-53,03	mpg	-53,03	
TGCATTGGGACTGCTCGCCG	-51,09	mpg	-51,09	

3.2. Thiết kế và nhân dòng miRNA nhân tạo

Thông tin đoạn gen *MPG1* đã nhân dòng của các mẫu nấm nghiên cứu được sử dụng để thiết kế miRNA nhân tạo. Phần mềm thiết kế miRNA nhân tạo WMD3 đưa ra một bảng danh sách các miRNA nhân tạo ứng viên (Bảng 2).

Một trong những tiêu chí quan trọng giúp miRNA nhân tạo bắt cặp tốt với mRNA mục tiêu để phức hợp RISC bám vào và phân cắt sợi mRNA là năng lượng liên kết giữa miRNA nhân tạo với sợi mRNA mục tiêu phải đủ lớn. Năng lượng liên kết này nằm trong khoảng -35 đến -40 kcal/mol là thích hợp cho sự bắt cặp và không nên cao quá -30 kcal/mol. Bên cạnh tiêu chí

trên, các tiêu chí khác như: không có lỗi trong vị trí 2-12 của miRNA nhân tạo đối với tất cả các mục tiêu; vị trí số 1 là Uridine (U), vị trí số 10 là Adenine (A) hoặc Uridine (U); có 1 (hoặc 2) lỗi ở đầu 3' của miRNA nhân tạo (vị trí 18-21); vị trí mục tiêu nằm ở đầu 3' của vùng mã hóa và làm câm gen đặc hiệu (chỉ làm câm gen mục tiêu mà không làm câm các gen khác) cũng được xem xét trong việc lựa chọn miRNA nhân tạo thích hợp (Schwarz et al. (2003), Schwab et al. (2005); Warthmann et al. (2008)). Dựa vào các tiêu chí đã đề cập ở trên, 2 trình tự miRNA nhân tạo ứng viên đáp ứng tốt nhất tất cả các tiêu chí đã được lựa chọn để khảo sát. Trình tự và các thông tin

Thiết kế vector mang miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen MPG1 ở nấm đạo ôn (*Magnaporthe grisea*) gây bệnh trên lúa

về các miRNA nhân tạo lựa chọn được trình bày trong bảng 3. Để thuận tiện cho những bước nghiên cứu tiếp theo, các trình tự miRNA nhân tạo được kí hiệu là amiR-P1 và amiR-P2.

Sau khi lựa chọn được miRNA nhân tạo với những đặc điểm mong muốn, các trình tự miRNA được nhân dòng sử dụng các môi oligonucleotide được đưa ra bởi phần mềm WMD3 (Bảng 4). Kết quả nhân dòng bằng PCR cho thấy, đã nhân dòng thành công sản phẩm a,

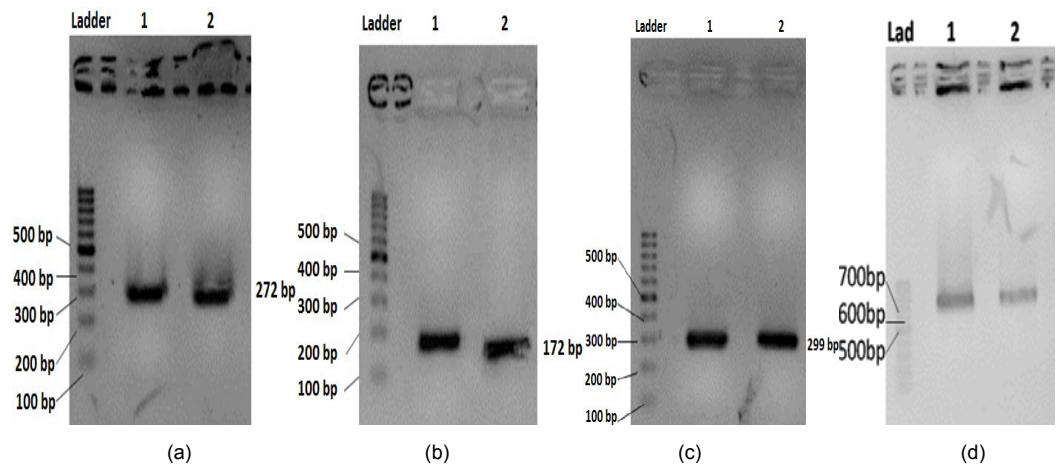
b, c (các sản phẩm theo quy trình mô tả bởi Schwab (2006), với kích thước sản phẩm đúng như mong muốn (kích thước các sản phẩm lần lượt là 272, 172 và 299bp) (Hình 3a, b, c). Các sản phẩm này được sử dụng để làm khuôn tổng hợp sản phẩm d (là precursor của miRNA nhân tạo theo quy trình của Schwab, 2006). Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy đã nhân dòng thành công sản phẩm d với kích thước vạch băng tương ứng 701bp (Hình 3d).

Bảng 3. Danh sách các trình tự miRNA nhân tạo lựa chọn

STT	Trình tự miRNA nhân tạo trưởng thành 5'-3'	Năng lượng liên kết $\Delta G = \Delta G_{int} + \Delta G_{u_s} + \Delta G_{u_l}$				% GC	Gen mục tiêu	Vị trí tác động trên mRNA
		ΔG	ΔG_{int}	ΔG_{u_l}	ΔG_{u_s}			
1	UGGGAGUCUAAAGAGUGGCUA	-39,48	-47,79	3,25	5,06	47,6	MPG1	27-47
2	UAGACGACCUUCUCGGCACCG	-36,81	-49,11	9,23	3,07	61,9	MPG1	224-244

Bảng 4. Kết quả tạo trình tự mỗi nhân dòng các miRNA nhân tạo bằng công cụ WMD3

amiR-P1	I miR-P1-s	gaTAGACGACCTTCTCGGCACCGtctctctttgtattcc	Chứa amiR-P1 xuôi chiều
	II miR-P1-a	gaCGGTGCCGAGAAGGTCGTCTAtcaaagagaatcaatga	Chứa amiR-P1 ngược chiều
	III miR*-P1-s	gaCGATGCCGAGAAGCTCGTCTTcacaggctgtagatg	Chứa đối bản amiR-P1 xuôi chiều
	IV miR*-P1-a	gaAAGACGAGCTTCTCGGCATCGtctacatatattctct	Chứa đối bản amiR-P1 ngược chiều
amiR-P2	I miR-P2-s	gaTGGGAGTCTAAAGAGTGGCTAtctctctttgtattcc	Chứa amiR-P2 xuôi chiều
	II miR-P2-a	gaTAGCCACTCTTTAGACTCCCAatcaaagagaatcaatga	Chứa amiR-P2 ngược chiều
	III miR*-P2-s	gaTAACCACTCTTTACTACTCCCTtcacaggctgtagatg	Chứa đối bản amiR-P2 xuôi chiều
	IV miR*-P2-a	gaAGGGAGTGTAAGAGTGGTTAtctacatatattctct	Chứa đối bản amiR-P2 ngược chiều



Hình 3. Kết quả PCR tổng hợp các sản phẩm (a), (b), (c) và (d).

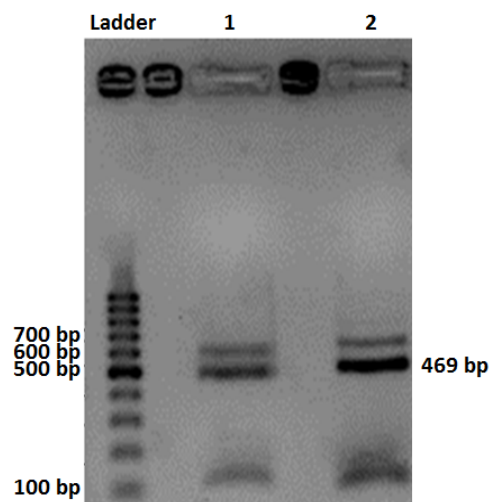
Ghi chú: 1: amiR-P1; 2: amiR-P2

3.3. Thiết kế vector RNAi mang cấu trúc miRNA nhân tạo

Vector pPS1 (Huang and Mason, 2004) được lựa chọn là vector biểu hiện cấu trúc miRNA nhân tạo. Theo lý thuyết, khi xử lý với enzyme plasmid pPS1 sẽ bị cắt tạo thành hai sản phẩm có kích thước tương ứng là 12400bp và 144bp, trên bản điện di sẽ thể hiện 2 vạch băng, một vạch tương ứng với sản phẩm có kích thước 12400bp, vạch còn lại tương ứng với sản phẩm có kích thước 144bp, còn sản phẩm (d) sẽ bị cắt thành 3 sản phẩm có kích thước tương ứng là 114bp, 469bp và 112bp, trên bản điện di sẽ thể hiện 2 vạch băng, một vạch tương ứng với sản phẩm có kích thước 469bp, vạch còn lại tương ứng với sản phẩm có kích thước 112bp và 114bp. Kết quả xử lý enzyme đối với plasmid pPS1 và sản phẩm (d) được thể hiện trên hình 4a,b. Kết quả điện di sản phẩm cắt đoạn (d) cho 3 vạch băng, trong đó có 2 sản phẩm đúng kích thước tính toán (469bp và 114 hay 112bp), sản phẩm còn lại có kích thước khoảng gần 600bp, đây là sản phẩm do 2 enzyme cắt không hoàn toàn. Sản phẩm có kích thước mong muốn 469bp có chứa trình tự miRNA nhân tạo và đối bản miRNA được gọi là pre-miRNA nhân tạo. Kết quả điện di sản phẩm xử lý enzyme giới hạn plasmid pPS1 cho thấy một vạch băng có kích thước lớn trên bản điện di, đây là sản phẩm mục tiêu mong muốn có kích thước 12400bp chứng tỏ plasmid pPS1 đã được cắt thành công. Sản phẩm 144bp có kích thước nhỏ và nồng độ thấp không được thể hiện trên bản điện di. Sản phẩm mục tiêu được thu hồi lại từ gel sử dụng kit GeneJET Gel Extraction (K0692, Fermentas) để cùng cho thí nghiệm ghép nối tạo thành plasmid tái tổ hợp mang pre-miRNA nhân tạo.

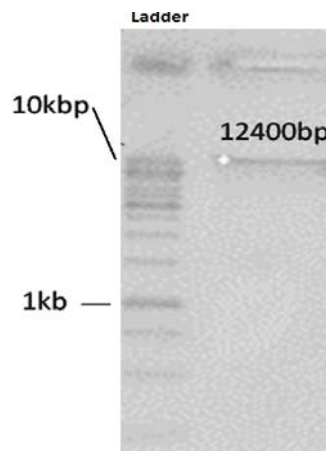
Do cùng được xử lý với enzyme *XhoI* và *XbaI* nên đoạn pre-miRNA nhân tạo có thể gắn vào pPSI tạo nên plasmid tái tổ hợp nhờ enzyme T4 DNA ligase (EL0014, Fermentas). Plasmid tái tổ hợp được kí hiệu là pPSI-pre-amiR. pPSI-pre-amiR sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng TOP10. Với mỗi cấu trúc miRNA nhân tạo, 2 khuẩn lạc được lựa chọn để kiểm tra PCR. Trên bản điện di sản phẩm PCR

cho thấy tất cả các khuẩn lạc kiểm tra đều cho một vạch băng sáng rõ có kích thước tương ứng với kích thước của pre-miRNA nhân tạo, chứng tỏ tất cả khuẩn lạc kiểm tra đều mang plasmid tái tổ hợp (vector biểu hiện pPS1 có mang miRNA nhân tạo) (Hình 5). Kết quả kiểm tra trình tự miRNA nhân tạo trong khung vector pPS1 cũng đã khẳng định cấu trúc miRNA nhân

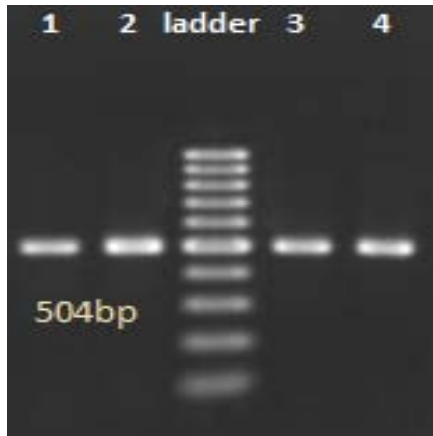


Hình 4a. Kết quả điện di sau khi cắt sản phẩm (d) với enzyme *XhoI* và *XbaI*

Ghi chú: 1: *amiR-P1*; 2: *amiR-P2*



Hình 4b. Kết quả điện di sau khi cắt plasmid tái tổ hợp pPSI với enzyme *XhoI* và *XbaI*



Hình 5. Kết quả kiểm tra sự có mặt của vector pPSI-pre-amiR trong các khuẩn lạc sau biến nạp bằng PCR

Ghi chú: 1,2: khuẩn lạc biến nạp vector pPSI-pre-amiR-P1
3,4: khuẩn lạc biến nạp vector pPSI-pre-amiR-P2

tạo cũng như miRNA precursor không bị đột biến trong quá trình nhân dòng bằng PCR. Như vậy, 02 vector biểu hiện ở thực vật pPS1 mang cấu trúc miRNA nhân tạo ức chế đặc hiệu gen *MPG1* ở nấm đạo ôn đã được thiết kế thành công.

Các vector này được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để chuyển gen miRNA nhân tạo vào cây lúa nhằm tạo cây lúa có khả năng kháng bệnh đạo ôn.

3.4. Chuyển miRNA nhân tạo vào cây lúa

Mô sẹo 3 tuần tuổi và 6 tuần tuổi của giống lúa J02 được tiến hành lây nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc pPS1-amiR-P1, với thời gian lây nhiễm khác nhau. Hiệu quả chuyển gen đạt 0,25-3,25% (Bảng 5). Với nguồn vật liệu mô sẹo non, thời gian lây nhiễm càng lâu thì số lượng mô sẹo sống sót sau chọn lọc càng giảm. Hiệu suất chuyển gen khi sử dụng mô sẹo 3 tuần tuổi cao nhất đạt 3,25% ở thời gian lây nhiễm 10 phút so với ở công thức thời gian lây nhiễm 20 và 30 phút với hiệu suất chuyển gen tương ứng là 0,5 và 0,25%. Tuy nhiên, Rahman et al. (2010) công

bố hiệu suất chuyển gen vào mô sẹo 3 tuần tuổi giống lúa MR219 cao nhất khi lây nhiễm dịch khuẩn với mẫu ở thời gian 30 phút. Như vậy, hiệu suất chuyển gen không những phụ thuộc vào độ tuổi của mô sẹo mà còn phụ thuộc vào giống. Sau quá trình lây nhiễm và chọn lọc, đã thu được 18 dòng cây tái sinh có trạng thái sinh trưởng bình thường. Các dòng tái sinh này cũng có khả năng ra rễ bình thường trên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh kanamycin (hình 6a). Việc ra rễ và sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc bước đầu đã có thể khẳng định các dòng cây tái sinh này là cây chuyển gen vì chỉ có những dòng được chuyển gen mới mang gen kháng kanamycin và do vậy mới có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa kanamycin. Các dòng tái sinh này sau đó được kiểm tra sự có mặt của promoter 2x35S và gen chuyển là pre-amiR-P1 sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di cho thấy 18 dòng tái sinh đều xuất hiện các vạch băng có kích thước như mong muốn và tương đương với đối chứng (+) (Hình 6 b). Như vậy, 18 dòng cây tái sinh này chính là các dòng chuyển gen.

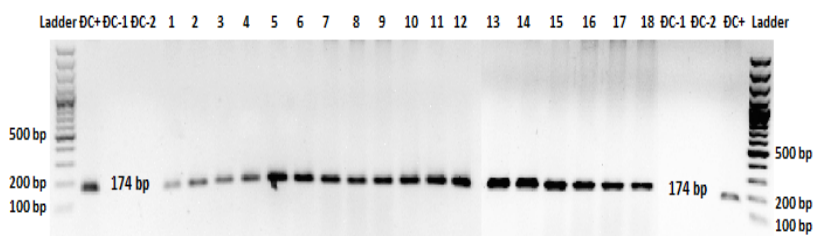
18 dòng lúa chuyển gen được đưa ra trồng trong điều kiện nhà lưới để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của chúng (Hình 7). Sau 60 ngày trồng, các dòng cây chuyển gen thích nghi và sống sót với chiều cao trung bình là 95-105cm, dạng hình gọn, dễ nhánh khá, góc lá hẹp, cứng cây, bộ lá xanh đậm, khỏe. Tính từ thời gian bắt đầu trồng là 13/06/2013 thì đến ngày 03/09/2013 các dòng lúa 1, 2, 4 bắt đầu trổ bông và kết thúc trổ vào ngày 08/09/2013. Dự kiến các dòng này sẽ được thu hoạch vào 05/10/2013, như vậy, thời gian sinh trưởng của các dòng này vào khoảng 110-115 ngày, tương đương với các dòng đối chứng không chuyển gen. Các dòng chuyển gen này sẽ tiếp tục được đánh giá về khả năng kháng bệnh đạo ôn thông qua các biotest cũng như phân tích sự biểu hiện của amiR-P1 và đánh giá hiệu quả hoạt động của amiR-P1 lên gen mục tiêu *MPG1*.

Bảng 5 . Kết quả chuyển gen vào mô sẹo 3 tuần tuổi (3W) và 6 tuần tuổi (6W) của giống J02

Chỉ tiêu	Số lượng khối mô sẹo lấy nhiễm với dịch khuẩn		Số mô sẹo sống sót sau chọn lọc		Số dòng cây tái sinh bình thường		Số dòng cây có gen chuyển khi phân tích PCR		Hiệu quả chuyển gen (%)	
Thời gian lấy nhiễm (phút)	3W	6W	3W	6W	3W	6W	3W	6W	3W	6W
10	400	-	154	-	10	-	10	-	3,25	-
20	400	200	113	125	2	3	2	3	0,50	2.0
30	400	200	54	106	1	2	1	2	0,25	1.0
Tổng số	1600		552		22		22			



(a)



(b)

Hình 6. Cây tái sinh ra rễ trên môi trường chọn lọc (a) và kết quả kiểm tra PCR pre-amiR-P1 (b)

Ghi chú: DC+: Đối chứng (+) là vector pPS1-pre-amiR-P1, DC-1: H₂O, DC-2: DNA cây lúa J02 không chuyển gen, 1-22: kí hiệu các dòng chuyển gen



Hình 7. Các dòng lúa chuyển gen mang cấu trúc pPS1-amiR-P1

Ghi chú: 1-18 kí hiệu các dòng lúa chuyển gen

4. KẾT LUẬN

Bốn đoạn gen MPG1 của 04 mẫu nấm đạo ôn khác nhau phân lập ở Việt Nam đã được nhân dòng và xác định trình tự. Thông tin trình tự các đoạn gen này đã được công bố trên ngân hàng gen với mã số: KF648283, KF648284, KF648285, KF648286.

Hai cấu trúc miRNA nhân tạo đã được thiết kế nhằm ức chế đặc hiệu gen *MPG1* ở nấm đạo ôn. Các miRNA nhân tạo này đã được nhân dòng và cài vào vector biểu hiện ở thực vật pPS1, các vector biểu hiện này được kí hiệu là pPS1-pre-amiR-P1 và pPS1-pre-amiR-P2.

Cấu trúc pre-amiR-P1 được chuyển vào cây lúa giống J02 và thu được 18 dòng cây chuyển gen. Sau 60 ngày trồng trong điều kiện nhà lưới, các dòng lúa chuyển gen có khả năng thích nghi và sống sót, hiện đang sinh trưởng và phát triển bình thường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp trường trọng điểm “Thiết kế vector RNAi phục vụ tạo giống lúa chuyển gen kháng bệnh đạo ôn”, mã số: T2011-12-8TĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Huang C.L., Hwang S.Y., Chiang Y.C. and Lin T.P. (2008). Molecular Evolution of the Pi-ta Gene Resistant to Rice Blast in Wild Rice (*Oryza rufipogon*). *Genetics*, 179: 1527–1538.
- Huang Z., Mason H.S. (2004). Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Biotechnology*, 2: 241–249.
- Irie T., Matsumura H., Terauchi R., Saitoh H. (2003). Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) of *Magnaporthe grisea*: genes involved in appressorium formation. *Molecular Genetics Genomics*, 270: 181–189.
- Jia Y., McAdams S.A., Bryan G.T., Hershey H.P. and Valent B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 19(15): 4004-4014.
- Kadotani N., Nakayashiki H., Tosa Y., and Mayama S. (2003). RNA Silencing in the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe oryzae*. *MPMI*, 16(9): 769–776.
- Lê Cẩm Loan, Nguyễn Đức Tài, Phạm Văn Dư (2006). Hiệu lực của gen kháng bệnh đạo ôn (*Pyricularia grisea*) trên lúa. *Báo cáo khoa học Hội thảo quốc gia Bệnh cây và Sinh học phân tử*, lần thứ 5 – Đại học Nông nghiệp Hà Nội, 98-101.
- Liu S.P., Li X., Wang C.Y., Li X.H., He Y.Q. (2003). Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection. *Acta Botanica Sinica*, 45(11): 1346-1350.
- Nguyễn Hoàng Lộc, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Văn Song, Phan Thị Phương Nhi, Trương Thị Trâm Chi, Dương Thị Thảo Trang (2008). Phân tích gen Pi-ta kháng bệnh đạo ôn ở một số giống lúa (*Oryza sativa* L.). *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 2(6): 221-226.
- Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Thị Lang (2004). Ứng dụng chỉ thị phân tử SSR (Simple - sequence - repeat) và STS (Sequence tagged site) marker để chọn giống lúa kháng bệnh đạo ôn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 12:1669-1672.
- Orbach M.J., Farrall L., Sweigard J.A., Chumley F.G. and Valent B. (2000). A Telomeric Avirulence Gene Determines Efficacy for the Rice Blast Resistance Gene Pi-ta. *The Plant Cell*, 12:2019–2032.
- Ozawa K.. (2008). Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Sci.*, 176: 522-527.
- Phan Hữu Tôn (2004). Khả năng chống bệnh đạo ôn (*Pyricularia oryzae*) Bắc Việt Nam và đặc điểm nông sinh học một số dòng lúa chứa gen chống bệnh. *Tạp chí KHKT Nông nghiệp*, 1(2): 3-8.
- Rahman Z.A. (2010). Production of transgenic *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) Cv. MR 81 via particle bombardment system. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(5): 353-366.
- Rahman Z.A., Zulkifli A.S., Naziah B., Advina L.J., Zamri Z. and Sreeramanan S. (2011). Preliminary investigations of Agrobacterium-mediated transformation in indica rice MR219 embryogenic callus using gusA gene. *African Journal of Biotechnology*, 40: 7805-781.
- Ramkumar G., Biswal A.K., Mohan K.M., Sakthivel K., Sivarajani A.K.P., Neeraja C.N., Ram T., Balachandran S.M., Sundaram R.M., Prasad M.S., Viraktamath B.C. and Madhav M.S. (2010). Identifying novel alleles of rice blast resistance genes *Pik^h* and *Pita* through allele mining. *International Rice Research Notes*, 0117-4185.
- Roberts J.K., Pitkin J.W., Adams T.H. (2008). In planta RNAi control of fungi. US Patent Application 20080022423.

- Scardaci S.C. (2003). A New Diseases in California. University of California-Davis: Agronomy Fact Sheet Series 1997-2.
- Schwab, R., Palatnik J.F., Riester M., Schommer C., Schmid M. and Weigel D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cel.*, 8: 517–527.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., and Weigel D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cel.*, 18: 1121–1133.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. and Zamore P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cel.*, 115: 199–208.
- Seidman C.E., Struhl K., Sheen J. and Jessen T. (1997). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Shahzadi R., Ahmed A.H. and Shah M.M. (2010). Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genet Mol. Res.*, 9: 386-393.
- Tabien R.E., Li Z., Paterson A.H., Marchetti M.A., Stansel J.W., Pinson S.R.M. (2000). Mapping of four major rice blast resistance genes from ‘Lemont’ and ‘Teqing’ and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1215–1225.
- Talbot N.J., Kershaw M.J., Wakley G.E., De Vries O., Wessels J. (1996). MPG1 Encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cel.*, 8: 985–999.
- Talbot N.J., Y.P. Salch, M. Ma and J.E. Hamer (1993). Karyotype variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 585-593.
- Talbot N.J., Kershaw M.J., Wakley G.E., De Vries O., Wessels J., et al. (1996) MPG1 Encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cel.*, 8: 985–999.
- Valent B. and Trick H. (2006). Use of RNA interference for fungal disease resistance. <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/201494.html>. Cited 15/05/2011.
- Van de Craen M., Goh P.Y., Logghe M.G., Khu Y.L., Mortier K. and Bogaert T.A.O.E (2006). Method for down-regulating gene expression in fungi. US Patent application publication. 20060247197.
- Van de Craen M., Goh P.Y., Logghe M.G., Khu Y.L., Mortier K. and Bogaert T.A.O.E (2010). Method for down-regulating gene expression in fungi. US Patent application publication. 20100311819.
- Warthmann N., Chen H., Ossowski D., Weigel S., Hervé P. (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS One*. 3(3): 18-29.