

# Thiết kế vector chuyển gen kháng virus phổ rộng mang gen chọn lọc thân thiện với môi trường bằng công nghệ RNAi

Nguyễn Trung Hiếu<sup>3</sup>, Lê Thị Thuý<sup>2</sup>,  
Phạm Thị Vân<sup>1</sup>, Lê Hồng Điệp<sup>3</sup>, Lê Văn Sơn<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm KH&CN Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 5 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 12 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 3 năm 2016

**Tóm tắt:** Dịch bệnh hại trên cây trồng diễn biến rất phức tạp, đặc biệt là bệnh do virus, gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng sản phẩm cây trồng. Hiện nay, tạo giống cây trồng có khả năng kháng đồng thời nhiều loại bệnh virus là hướng chiến lược quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, cây trồng biến đổi gen hiện nay chưa được chấp nhận rộng rãi, do mối lo ngại đến sức khỏe người tiêu dùng, cũng như ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái. Việc tạo được vector chuyển gen kháng virus phổ rộng mang gen chọn lọc tích cực nhằm tạo ra cây trồng biến đổi gen thân thiện với môi trường sẽ góp phần làm giảm thiệt hại về năng suất, chất lượng sản phẩm cây trồng, đồng thời thúc đẩy việc thương mại hoá sản phẩm cây trồng chuyển gen. Trong nghiên cứu này, một vector chuyển gen pK7M/TCYS mang gen chọn lọc tích cực manA và cấu trúc ihpRNA TCYS dưới sự điều khiển của promoter P35S đã được thiết kế. Gen đa đoạn TCYS có kích thước 1000 bp gồm các vùng gen chức năng không đầy đủ và có tính bảo thủ cao đại diện cho bốn loài virus phân lập 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). Vector này đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *A.tumefaciens* chủng CV58C1 tạo nguyên liệu cho nghiên cứu tạo các loại cây trồng chuyển gen kháng đa virus và thân thiện với môi trường.

*Từ khóa:* CMV, manA, RNAi, TMV, TSWV, TYLCV.

## 1. Mở đầu

Hiện nay, dịch bệnh trên cây trồng diễn biến rất phức tạp, một loại cây trồng có thể bị nhiễm nhiều loại bệnh khác nhau, đặc biệt là

các bệnh do virus gây nên, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cũng như chất lượng sản phẩm cây trồng. Các biện pháp canh tác hiện nay chỉ có thể làm hạn chế tác hại của virus và kiểm soát chúng ở mức độ nhất định như sử dụng giống sạch bệnh, xử lý đồng ruộng trước và sau canh tác [1]. Do vậy, việc nghiên cứu tạo cây trồng có khả năng kháng được đồng

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84- 977589448  
Email: les03@yahoo.com

thời nhiều loại bệnh khác nhau có ý nghĩa vô cùng to lớn đối với nền nông nghiệp của đất nước.

Việc ứng dụng công nghệ sinh học vào trong tạo giống cây trồng đang được ưu tiên phát triển hàng đầu hiện nay. Trong đó, công nghệ RNAi đang được quan tâm nhiều nhất trong nghiên cứu tạo giống cây trồng chuyển gen kháng lại một số loài virus gây bệnh ở 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 mã (RNAi), đã có nhiều công trình nghiên cứu được thực hiện nhằm tạo ra các vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi chứa các trình tự gen của virus gây bệnh. 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].

Công nghệ tạo cây trồng biến đổi gen thường liên quan tới việc sử dụng một gen chỉ thích hợp để ưu tiên cho sự tái sinh của chồi. Trong hệ thống chọn lọc truyền thống, gen chọn lọc thường được sử dụng là một trong hai loại gen kháng kháng sinh hygromycin (hpt), kanamycin (nptII), hoặc gen kháng chất diệt cỏ phosphinothricin (bar) và chlorosulfuron (als) [7]. Tuy nhiên, sự có mặt của các gen này thường gây ra những tác dụng không mong muốn tới sản phẩm cuối cùng cho người sử dụng cũng như tác động xấu đến môi trường sinh thái [8]. Để khắc phục những vấn đề này, các chiến lược nhằm loại bỏ một trong hai gen chọn lọc từ cây trồng hoặc tránh việc lựa chọn các tế bào chọn lọc bằng chỉ thị kháng sinh hay thuốc diệt cỏ. Trong đó, phương pháp dựa trên hệ thống “chọn lọc tích cực” đang trở nên ngày càng phổ biến, được thay thế các gen chỉ thị chọn lọc kháng kháng sinh hoặc kháng thuốc diệt cỏ. Hệ thống này dựa trên sự biến đổi của tế bào thực vật để chuyển hoá các hợp chất mà cây trồng thông thường không chuyển hoá được [9]. Gen *manA* có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia coli* hoá cho enzyme

phosphomannose-isomerase (pmi) [10], xúc tác chuyển hoá đường mannose-6-phosphate thành đường fructose-6-phosphate để tế bào sử dụng. Tế bào được chuyển gen *manA* có thể sử dụng đường mannose như một nguồn carbon và phát triển bình thường trong môi trường có mặt mannose.

Trong nghiên cứu này, một vector chuyển gen RNAi pK7M/TCYS-CPi mang đa đoạn gen chức năng không đầy đủ của 4 loại virus gây bệnh 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) và chọn lọc cây chuyển gen trên môi trường có chứa đường mannose.

## 2. Vật liệu và 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 nt của đoạn gen đa đoạn TCY (TCY chứa 304 nt của CP TMV nối 255 nt của CP CMV [11] ghép nối với đoạn gen đa đoạn nhân tạo của TYLCV gồm 112nt của CP, 101 nt C1/C2, 127 nt C1/C4 và 130 ntcủa  $\beta$ C1); 2) Vector tách dòng pENTR/TSWV mang 270 nt 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), vector pNOV-gusplus, 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).

Các chủng vi khuẩn *E. Coli* chủng One Shot TOP 10, DB 3.1, DH5 $\alpha$ ; vi khuẩn *Agrobacterium*

*tumefaciens* CV58C1 mang gen gây độc pGV2260.

Tất cả các nguồn vật liệu đều được cung cấp bởi phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### Phương pháp nghiên cứu

##### Thiết kế cấu trúc 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<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> (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) có vai trò trong việc ghép nối đoạn gen TCY với TSWV-CPi.

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	GCAAAACTCGCAGAAGTGTGATGATA
TSWV-CP-Ri-1	TTGCCATAATGCTAGGAGGT

PCR khuếch đại và ghép nối tạo TCYS được thực hiện theo 5 bước sau:

**Bước 1:** PCR khuếch đại đoạn gen đa đoạnTCY từ pENTR/TCY bằng cặp môi TMV-CP-Fi-2/cTYLCV-TSWV-Ri-1. Thành phần gồm 2,5 µl đệm PCR, 2µl dNTPs, 0,25 µl Taq Pfu, 1 µl mỗi loại môi, 1-2 ng plasmid pENTRY/TCY và bổ sung nước tới tổng thể tích cuối cùng là 25 µl. Chu kỳ nhiệt: 94°C 3'; 25 chu kỳ (94°C 1'; 52°C 1'; 72°C 1'30''); 72°C 10'; 4°C α. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 747 bp.

**Bước 2:** PCR khuếch đại đoạn gen CP bảo thủ của TSWV bằng cặp môi cTYLCV-TSWV-Fi-1/TSWV-CP-Ri-1. Sản phẩm có kích thước khoảng 280 bp.

**Bước 3:** Điện di, chụp ảnh và thôi gel tinh sạch sản phẩm PCR ở bước 1 và 2.

**Bước 4:** Thực hiện PCR với thành phần gồm 5µl đệm PCR, 5µl dNTPs, 0,5µl Taq Pfu, 1-2 ng sản phẩm PCR được tinh sạch từ bước 1 và 2. Thực hiện chu kỳ nhiệt: 94°C 3'; 5 chu kỳ (94°C 1'; 60°C 1'; 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C α.

**Bước 5:** Bổ sung 2 µl môi mỗi loại TMV-CP-Fi-2 và TSWV-CP-Ri-1 vào ống PCR, thực

hiện tiếp phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt như sau: 94°C 3'; 25 chu kỳ (94°C 1'; 52°C 1'; 72°C 1'30''); 72°C 10'; 4°C α. Sản phẩm PCR cuối cùng có kích thước khoảng 1000 bp.

*Thiết kế vector RNAi mang cấu trúc gen chọn lọc bằng đường mannose*

Vector RNAi gốc chọn lọc bằng đường mannose được tạo ra bằng cách cắt và nối giữa vector chuyển gen pK7GWIWG2(II) với vector pNOV-gusplus có chứa gen *manA*.

Sử dụng các enzyme cắt giới hạn *SphI*, *HindIII* và enzyme tạo đầu bằng T4 DNA polymerase để tạo trình tự RNAi từ vector pK7GWIWG2(II). Trình tự gen *manA* thu được từ vector pNOV-gusplus nhờ phản ứng cắt bởi 2 enzyme *PmeI* và *HindIII*. Sản phẩm cắt của hai vector sau đó được ghép nối với nhau nhờ enzyme T4 ligase để tạo ra vector RNAi mang cấu trúc gen chọn lọc bằng đường mannose (ký hiệu: pK7M). Sản phẩm sau đó được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DB3.1 và được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR và cắt bởi enzyme hạn chế *XbaI*, *HindIII*.

Thiết kế vector chuyển gen RNAi mang cấu trúc TCYS chọn lọc bằng đường mannose.

Sử dụng kỹ thuật Gateway (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) để gắn cấu trúc TCYS từ vector pEN/TCYS vào vector RNAi pK7M chứa gen *manA*. Sản phẩm phản ứng sẽ được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 $\alpha$ . Chọn lọc những khuẩn lạc dương tính trên môi trường LB có bổ sung streptomycin 40mg/l, spectinomycin 100mg/l và chloramphenicol 34mg/l. Các dòng plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR trực tiếp trên khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu TMV-Fi-2/TSWV-Ri-1 và được kiểm tra bằng cắt enzyme *Xba*I và *Hind*III.

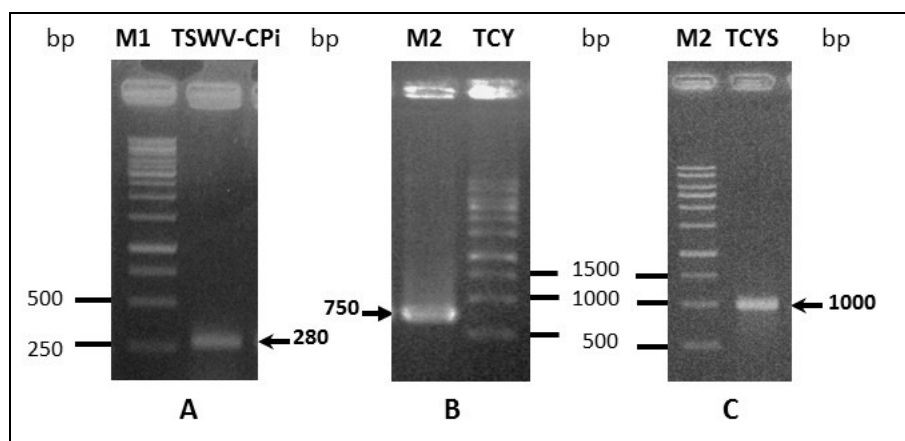
*Tạo chủng vi khuẩn A.tumefaciens mang cấu trúc RNAi pK7M/TCYS*

Các plasmid tái tổ hợp tiếp tục được biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng CV58C1 pGV2260 bằng phương pháp xung điện. Chọn lọc trên môi trường YEP có bổ sung kháng sinh rifamicyne 50mg/l, streptomycin 40mg/l và chloramphenicol 34 mg/l. Sau đó, khuẩn lạc được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu TMV-Fi-2/TSWV-Ri-1.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Thiết kế cấu trúc gen đa đoạn TCYS

Sự ức chế gen ngoại lai bằng cơ chế RNAi chỉ xảy ra khi có sự tương đồng giữa các siRNA với gen đích. Việc ghép nối trình tự gen bảo thủ của 4 loài virus lại và để chúng cùng hoạt động khi chuyển vào thực vật là công việc rất phức tạp. Ngoài các trình tự gen CP có sẵn, một đoạn gen nhân tạo của cTYLCV đã được tổng hợp nhân tạo để nối với trình tự CP của các loài virus CMV và TMV[10]. Kết quả điện di trên gel agarose 1% (hình 1) đã thu được một băng DNA có kích thước khoảng 750 bp (mẫu số 2), tương ứng với kích thước đoạn gen TCY theo tính toán lý thuyết. Đoạn gen này tiếp tục được thu lại sử dụng để ghép nối với đoạn CP dài 270 bp của virus TSWV được cắt ra từ vector pENTR/TSWV (mẫu số 1). Kết quả sản phẩm ghép nối (mẫu số 3) cho thấy một băng DNA có kích thước khoảng 1000 bp. Sản phẩm sau đó được gắn thành công vào vector tách dòng pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> dưới sự xúc tác của enzyme DNA topoisomerase tạo thành vector pEN/TCYS và được biến nạp vào tế bào *E.coli* One Shot TOP 10.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm ghép nối cấu trúc đoạn gen TCYS.

1) Sản phẩm PCR nhân đoạn CPi TSWV bằng cặp mồi cTYLCV-TSWV-Fi-1/TSWV-CP-Ri-1; 2) Sản phẩm PCR nhân đoạn TCY bằng cặp mồi TMV-CP-Fi-2/ cTYLCV-TSWV-Ri-1; 3) 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).

Để khẳng định cấu trúc TCYS đã được thiết kế thành công, những dòng khuẩn lạc dương tính đã được thu nhận để xác định trình tự gen đa đoạn. Kết quả đọc trình tự (hình 2) cho thấy đoạn gen thu được có trình tự đúng như mong muốn. Trong đó chứa 4 đoạn gen CP của 4 virus TMV, CMV, cTYLCV và TSWV. Từ kết

quả đọc trình tự đoạn TCYS, chúng tôi đã xác định được trình tự và vị trí gắn của các cặp môi đặc hiệu (phần in đậm và có mũi tên). Các cặp môi này sẽ được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen TCYS khi chèn vào vector chuyển gen RNAi pK7M.



Hình 2. Trình tự đoạn gen đa đoạn TCYS và vị trí các môi.

Font chữ in thường: trình tự đoạn gen TMV-CP; Font chữ in nghiêng và gạch dưới: trình tự đoạn gen CMV-CP; Font chữ in đậm: trình tự đoạn gen cTYLCV-CP; Font chữ in thường và gạch dưới: trình tự đoạn gen TSWV-CP; Mũi tên: vị trí các môi.

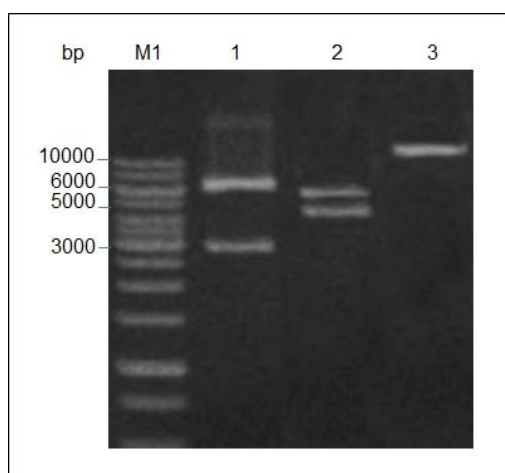
### 3.2. Thiết kế vector RNAi mang cấu trúc gen chọn lọc bằng đường mannose

Kết quả điện di kiểm tra trên gen agarose 1% (Hình 3) cho thấy, sản phẩm cắt từ vector pNOV-gusplusthu được 2 phân đoạn kích thước khoảng 7000 bp và 3500 bp (mẫu số 1). Trong đó, đoạn có kích thước khoảng 7000 bp, tương ứng với kích thước của gen *manA* mã hoá cho PMI cần quan tâm, được tinh sạch để tiếp tục làm phản ứng ghép nối với cấu trúc RNAi.

Để thiết kế cấu trúc RNAi, một vector pK7GIW2(II) đã được cắt bằng enzyme *SphI*. Kiểm tra sản phẩm cắt trên gel agarose 1% thu được chứa đoạn gen có kích thước khoảng 4935 bp (mẫu số 2), là đoạn DNA mang cấu trúc RNAi chứa *ccdB* và intron. Vì enzyme *SphI* cắt tạo đoạn gen có đầu so le, nên sản phẩm sau khi cắt được tạo đầu bằng nhờ enzyme *T4 DNA polymerase*. Đoạn gen tiếp tục được xử lý bằng enzyme *HindIII* để tạo vị trí gắn tương thích với gen *manA*.

Đoạn gen RNAi cắt từ vector pK7GIW(II) được ghép nối với gen *manA* nhờ enzyme *T4 ligase* để tạo thành vector chuyển gen pK7M. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào vi khuẩn *E.Coli* DB3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp môi đặc

hiệu Manno-Fi/Manno-Ri trên gel agarose 1% (Hình 3) đã thu được một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 12000 bp (mẫu số 3), tương ứng với kích thước của sản phẩm ghép nối pK7M theo như tính toán trên lý thuyết.



Hình 3. Ảnh điện di kết quả thiết kế vector pK7M

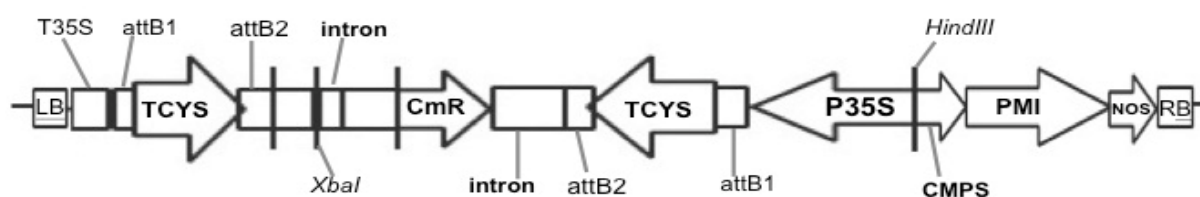
1: sản phẩm cắt từ vector pNOV-gusplus; 2: sản phẩm cắt từ vector pK7GWIWG2(II); 3: kết quả sản phẩm nối bằng T4 ligase; M1: GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA ladder (Fermentas).

### 3.3. Thiết kế vector chuyển gen RNAi mang cấu trúc gen đa đoạn chọn lọc bằng đường mannose

Kỹ thuật Gateway được sử dụng rộng rãi để thiết kế cấu trúc RNAi dựa trên các phản ứng tái tổ hợp tại những vị trí đặc hiệu của vi khuẩn Lambda. Kỹ thuật này cho phép chuyển đoạn DNA giữa các vector tách đồng với vector đích khác nhau và nối các đoạn DNA trong một trình tự xác định trước, định hướng theo khung đọc mở.

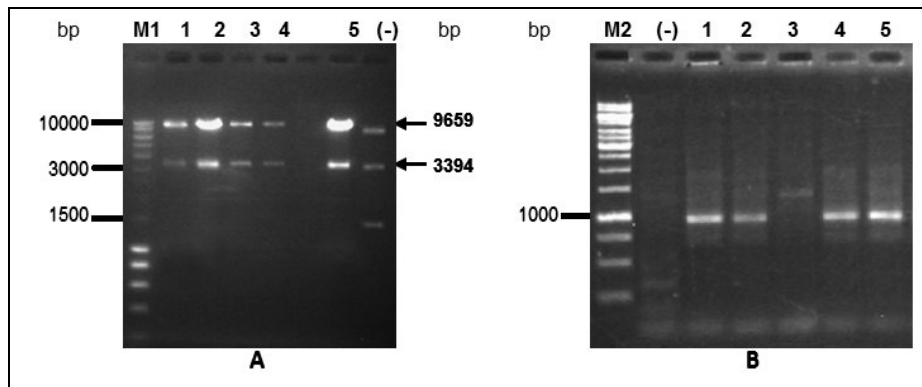
Kỹ thuật Gateway gồm hai loại phản ứng LR (là phản ứng tái tổ hợp giữa các vị trí *attL* và *attR*) và BP (là phản ứng tái tổ hợp giữa các vị trí *attB* và *attP*). Trong nghiên cứu này, phản ứng LR được sử dụng để chuyển gen CP của bốn loại virus TMV, CMV, TYLCV và TSWV có trong vector pENTR/TCYS chứa trình tự *attL* ở 2 đầu đoạn gen TCYS vào vector tiếp nhận pK7M có chứa các vị trí *attR* dưới sự xúc tác của enzyme *LR Clonase*<sup>TM</sup> II. Kết quả tạo ra một vector biểu hiện mang cấu trúc RNAi (ký hiệu là pK7M/TCYS) với hai vị trí chèn đoạn TCYS theo chiều sense và antisense được ngăn cách bởi một đoạn intron, dưới sự điều khiển của promoter 35S (Hình 4).

Cấu trúc vector này đã được kiểm tra thành công bằng phản ứng colony-PCR và enzyme cắt hạn chế *XbaI*, *HindIII* (Hình 5).



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc vector pK7M/TCYS

LB: Left T-DNA border; T35S: Terminator 35S; attB1, attB2: Các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng LR; TCYS: gen đa đoạn; CmR: gen kháng Chloramphenicol; P35S: Promoter 35S của Cauliflower mosaic virus; PMI: gen chuyển hoá đường mannose thành nguồn cacbon để cây sử dụng được; RB: Right T-DNA border; vị trí cắt của enzyme giới hạn *XbaI* và *HindIII*.



Hình 5. Ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pK7M/TCYS bằng enzyme XbaI/HindIII (A) và PCR bằng mồi đặc hiệu TMV-Fi-2/TSWV-Ri-1 (B).

M1: Smartladder 1 Kb (Erogenetic); M2: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); 1-5A và 1-3B: Khuẩn lạc E.coli; 4-5B: Khuẩn lạc A.tumefaciens; (-)A: Đối chứng âm vector pK7GWIWG2(II), (-) B: Đối chứng âm là nước.

## Kết luận

Vector chuyển gen RNAi mang cấu trúc đa đoạn TCYS và gen chọn lọc tích cực trên môi trường có chứa mannose đã được thiết kế thành công. Cấu trúc này đã được chuyển thành công vào vi khuẩn *A.tumefaciens* CV58C1. Đây là nguồn vật liệu quan trọng cho tạo cây chuyển gen kháng đồng thời 4 loại virus TMV, CMV, TLYCV và TSWV. Ngoài ra cây chuyển gen sẽ không ảnh hưởng tới môi trường nhờ sử dụng gen chọn lọc mannose.

## Lời cảm ơn

Công trình được hỗ trợ về 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 ADN ứng dụng, 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] 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.

[4] 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.

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

[6] Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremeth-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.

[7] Bowen BA: Markers for plant gene transfer. In: Kung SD, Wu R (eds) Transgenic Plants, vol.1, pp. 89-146. Academic Press, New York (1993).

[8] Flavell RT, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT: Selectable marker genes: safe for plants? Bio/technology 10: 141-144 (1992).

[9] Joersbo M, Okkels T (1996) A novel principle for selection of trans- genic plant cells: Positive selection. Plant Cell Rep 16:219-221

- [10] Miles J. S., Guest J. R., 1984. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.
- [11] Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, Cây thuốc lá chuyển 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.

## Designing Transgenic Vector Carrying Environmentally Friendly Gene Resistance to Wide Spectrum Virus by RNAi Technology

Nguyễn Trung Hiếu<sup>3</sup>, Lê Thị Thủy<sup>2</sup>, Phạm Thị Vân<sup>1</sup>, Lê Hồng Điệp<sup>3</sup>, Lê Văn Sơn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Hanoi National University of Education, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** The diseases on plants are complex progressing, especially viral diseases, causing serious harm to yield and quality of agro-products. The main research strategies are prioritizing to create plant varieties that are resistant to many kind of viral diseases. However, genetically modified crops have not yet been widely adopted due to health concerns of consumers and adverse effects of ecological environment. Transgenic plants resistant to wide spectrum viruses and friendly environment are desired by many farmers. In this study, a transgenic vector pK7M/TCYS containing RNAi TCYS structure and *manA* gene was designed. The 1000 bp-length multi-fragments TCYS gene carrying sequencethat encodes for coat protein (CP) of four viral species including TMV (Tobacco mosaic virus), CMV (Cucumber mosaic virus), TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus) and TSWV (Tomato spotted wilt virus), was successfully designed and transformed into *A.tumefaciens* with *manA* gene. This is a prerequisite for creating friendly-environmenttransgenic crops.

*Keywords:* CMV, *manA*, RNAi, TMV, TSWV, TYLCV.