

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN RNAi QUA TRUNG GIAN *Agrobacterium tumefaciens* VÀO *Dendrobium Sonia* ĐỂ TẠO GIỐNG KHÁNG VIRUS KHẢM VÀNG

Nguyễn Xuân Dũng^{1*}, Dương Hoa Xô¹, Nguyễn Thị Thanh Thảo¹, Chu Hoàng Hà²

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

Email*: nguyentuanxundung294@gmail.com

Ngày gửi bài: 30.07.2014

Ngày chấp nhận: 13.03.2015

TÓM TẮT

Nhằm tạo dòng lan kháng CyMV (*Cymbidium mosaic virus*), protocorm like bodies (PLBs) của lan *Dendrobium Sonia* đã được gây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen RNAi được thiết kế từ gen mã hóa protein vỏ (CP) của CyMV. Sau đó, PLBs chuyển gen được khử khuẩn với cefotaxime 300 mg/l và sàng lọc với kanamycin 500 mg/l. Kết quả, đã thu được các dòng PLBs phát triển trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin 500 mg/l. Sự hiện diện của gen mục tiêu trong các dòng PLBs này đã được khẳng định bằng PCR.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển nạp gen, *Dendrobium Sonia*, RNAi.

Studies on *Agrobacterium tumefaciens* - Mediated Transfer of RNAi to *Dendrobium Sonia* for Resistance to CyMV

ABSTRACT

In order to produce a *Dendrobium* lines resistant to CyMV (*Cymbidium mosaic virus*), protocorm like bodies (PLBs) of *Dendrobium Sonia* were infected with *Agrobacterium tumefaciens* C58 carrying plant transgenic vector pK7GW1WG2 (II)/CP, containing RNAi structure of coat protein gene (CP) alone or in combination with ORF2-4 gene of CyMV. The transformed PLBs were disinfected with cefotaxime 300 mg/l and screened for kanamycin 500 mg/l. Viable PLB-derived lines were obtained after the screening. The presence of the target gene in these lines was confirmed by PCR.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Dendrobium Sonia*, CyMV, RNAi, transformation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus khảm vàng (*Cymbidium mosaic virus* - CyMV) là một trong những virus gây hại phổ biến và nghiêm trọng nhất hiện nay trên hoa lan (Zettler et al., 1990). Chúng gây nhiễm trên tất cả các giống lan lai được kiểm tra ở một số vùng trồng lan chính của Việt Nam. Mức độ nhiễm khá cao ở các vùng có tiềm năng sản xuất hoa lan lớn như Thành phố Hồ Chí Minh, Đà Lạt và Hà Nội (Lê Thị Ánh Hồng và cs., 1999). So với nhiều giống lan khác, giống lan *Dendrobium* được trồng ở Thành phố Hồ Chí Minh chỉ bị nhiễm với

CyMV (65,7%) mà hoàn toàn không bị nhiễm với ORSV (Nguyễn Xuân Dũng và cs., 2009). Như vậy, nếu khống chế được CyMV thì sẽ giải quyết cơ bản được bệnh virus đối với giống lan này. Hơn nữa, bệnh do virus gây ra đến nay vẫn chưa có thuốc đặc trị. Biện pháp chủ yếu để kiểm soát virus vẫn là phòng tránh, vì vậy nhu cầu về giống lan có khả năng kháng loại virus này đang là vấn đề cấp thiết.

Sự can thiệp RNA (RNAi) được xem là một cơ chế quan trọng trong việc kháng lại virus ở thực vật (Baulcombe, 2004). Vì vậy, kỹ thuật chuyển gen dựa trên cơ chế can thiệp RNA đã

được ứng dụng để tạo giống cây trồng kháng virus. Nhiều giống cây trồng kháng được các loại virus khác nhau đã được tạo ra bằng kỹ thuật chuyển gen RNAi (Gottula and Fuchs, 2009). Ở Việt Nam cũng đã có một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen RNAi để tạo giống cây trồng kháng bệnh virus như: thuốc lá chuyển gen kháng virus khảm dưa chuột (*Cucumber mosaic virus*), kháng virus khảm thuốc lá (*Tobacco mosaic virus*) và kháng đồng thời cả hai loại virus này (Phạm Thị Vân và cs., 2008; Chu Hoàng Hà và cộng sự, 2009). Đây là tiền đề quan trọng mở ra khả năng ứng dụng kỹ thuật chuyển gen RNAi trên các loại cây trồng khác.

Dựa trên những kết quả có được về xây dựng quy trình chuyển gen cho lan *Dendrobium Sonia* bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (Nguyễn Xuân Dũng và cs., 2014) và thiết kế vector chuyển gen RNAi từ gen mã hóa protein vỏ (CP) của virus khảm vàng của cùng nhóm tác giả, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tạo ra giống lan *Dendrobium Sonia* có khả năng kháng virus thông qua việc chuyển cấu trúc gen RNAi được thiết kế từ gen CP của virus khảm vàng

(*Cymbidium mosaic virus*) vào PLBs của giống lan *Dendrobium Sonia*.

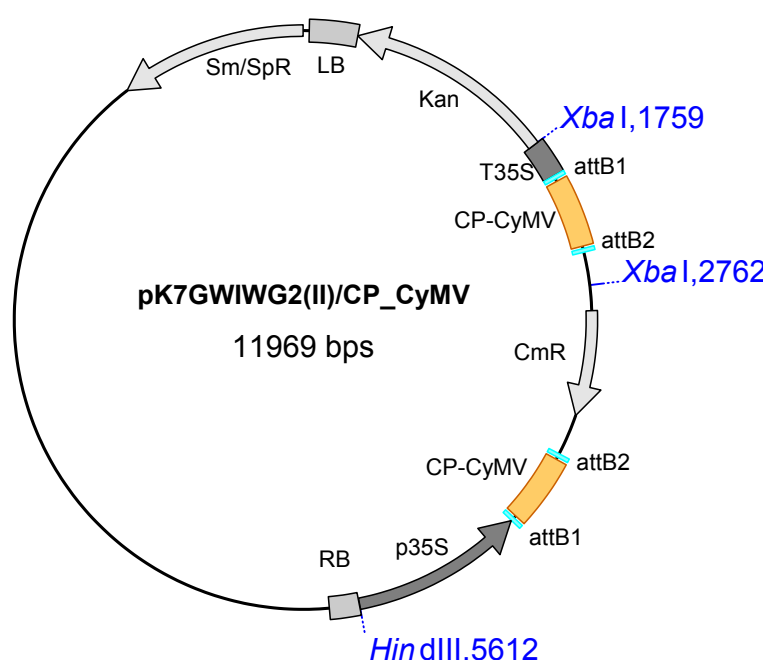
2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Protocorm-like bodies (PLBs) có nguồn gốc từ lát cắt mỏng thân của cây lan *Dendrobium Sonia in-vitro*.

- Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen thực vật pK7GWIWG2(II)/CP-CyMV. Vector này được thiết kế có chứa cấu trúc RNAi của một phân đoạn gen thuộc gen mã hóa cho protein vỏ (CP) của virus CyMV nhằm kích hoạt cơ chế làm im lặng gen CP của virus này khi chúng hiện diện trong tế bào cây chuyển gen. Trong đó, phân đoạn gen được đưa vào vector này có nguồn gốc từ việc khuếch đại trình tự gen CP đã được tạo dòng của virus CyMV với cặp mồi đặc hiệu

F-CCP1 (5'-CACCTGTCCGCCGCGCCTCTCTT-3') và R-CCP1 (5'-TCCGGCTAAGCATATTATGC-3') và gắn vào vector pK7GWIWG2(II) bằng kỹ thuật Gateway.



Hình 1. Cấu trúc của vector pK7GWIWG2(II)/CP-CyMV

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn

Vi khuẩn được tăng sinh qua đêm trong môi trường LB (3ml) có bổ sung ampicilin (50 mg/l), spectinomycin (50 mg/l) và rifamicine (50 mg/l), ở 28°C, tốc độ lắc là 200 vòng/phút. Sau đó, hút 1ml dịch tăng sinh chuyển vào 29ml môi trường LB có bổ sung kháng sinh như trên và tiếp tục tăng sinh qua đêm ở cùng điều kiện và tốc độ lắc. Các mẫu vi khuẩn sau khi tăng sinh được sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen.

2.2.2. Truyền cấu trúc RNAi của gen CP vào PLBs thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

+ Chuẩn bị vi khuẩn cho chuyển gen

Mẫu vi khuẩn sau khi tăng sinh được kiểm tra OD để đảm bảo giá trị OD nằm trong khoảng từ 0,6-1, sau đó tiến hành ly tâm thu sinh khối ở 8.000 vòng/phút trong 15 phút. Sinh khối vi khuẩn thu được sau khi ly tâm được pha loãng với môi trường MS lỏng (cùng thể tích tăng sinh) có bổ sung chất cảm ứng acetosyringone ở nồng độ 100µM.

+ Chuẩn bị PLBs và thực hiện nuôi cấy chung

Tiến hành tách riêng từng PLBs từ các cụm PLBs có nguồn gốc từ lát cắt mỏng thân của cây lan *Dendrobium Sonia in vitro*. Việc tách các PLBs được thực hiện trong môi trường MS lỏng. PLBs sau khi tách được ngâm trong môi trường MS + acetosyringone (100µM) trong 15 phút, ở 25°C. Sau đó, PLBs được chuyển sang ủ tiếp tục trong môi trường MS + acetosyringone có bổ sung thêm vi khuẩn (đã được chuẩn bị như trên) trong 30 phút ở cùng nhiệt độ. Sau khi ủ, PLBs được làm khô nhẹ bằng cách đặt trên giấy thấm và chuyển sang nuôi chung trên môi trường MS rắn có bổ sung 0,3 mg/l BA, 1 mg/l NAA và acetosyringone ở nồng độ 100µM, ủ trong 3 ngày. Các đĩa petri nuôi cấy chung được nuôi trong tối ở nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5°C.

+ Loại vi khuẩn từ PLBs bằng cefotaxime

Sau 3 ngày nuôi chung với vi khuẩn, PLBs được rửa 3 lần với nước cất vô trùng và rửa tiếp 1 lần với môi trường MS lỏng có bổ sung

cefotaxime ở nồng độ 300 mg/l. Sau khi rửa, làm khô nhẹ bề mặt PLBs bằng giấy thấm và cấy lên môi trường MS rắn có bổ sung 0,3 mg/l BA, 1 mg/l NAA và cefotaxime ở nồng độ tương tự như môi trường lỏng. Các đĩa petri đồng nuôi cấy được nuôi ở điều kiện ánh sáng 2500 ± 500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5°. Mẫu được theo dõi và cấy truyền sang môi trường khử khuẩn mới sau mỗi 7-10 ngày nuôi cho đến khi không còn sự hiện diện của vi khuẩn.

2.2.3. Sàng lọc PLBs mang cấu trúc chuyển gen bằng kanamycin

+ Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ kanamycin lên khả năng sống của PLBs

Các PLBs được nuôi cấy trên môi trường MS rắn có bổ sung 0,3 mg/l BA, 1 mg/l NAA và kanamycin ở các nồng độ 0, 100, 200, 300, 400, 500 và 700 mg/l. Các đĩa petri nuôi cấy được nuôi trong điều kiện ánh sáng 2500 ± 500 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5°C. Tỷ lệ PLBs chết/sống được theo dõi và ghi nhận theo thời gian để xác định nồng độ kanamycin giết chết PLBs.

+ Sàng lọc PLBs mang cấu trúc chuyển gen bằng nồng độ kanamycin thích hợp

Các PLBs sạch khuẩn được chuyển sang sàng lọc trên môi trường MS rắn có bổ sung 0,3 mg/l BA, 1 mg/l NAA và nồng độ kanamycin thích hợp cho mục đích sàng lọc. Các đĩa petri nuôi cấy được nuôi trong điều kiện ánh sáng 2500 ± 500 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5°C. Các mẫu còn sống được theo dõi và cấy chuyển sang môi trường sàng lọc mới sau thời gian thích hợp (được xác định trong thí nghiệm khảo sát nồng độ kháng sinh).

2.2.4. Phát hiện gen mục tiêu trong các mẫu giả định chuyển gen

Các mẫu chuyển gen sau khi sàng lọc trong môi trường kanamycin thích hợp trong 6-8 tuần được tách một phần, tiến hành trích ly DNA tổng số (sử dụng bộ kit trích ly DNA: DNeasy Plant Mini Kit, Quiagen) và kiểm tra sự hiện

diện của gen mục tiêu bằng phản ứng PCR với cặp mồi F-CCP1 (5'-CACCTGTCCGCCGCGCCTCTCTT-3') và R-CCP1(5'-TCCGGCTAAGCATATTATGC-3').

Đây là cặp mồi đã được sử dụng để khuếch đại đoạn gen mục tiêu sử trước khi gắn vào vector.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuyển gen CP vào PLBs thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1. Giai đoạn nuôi chung

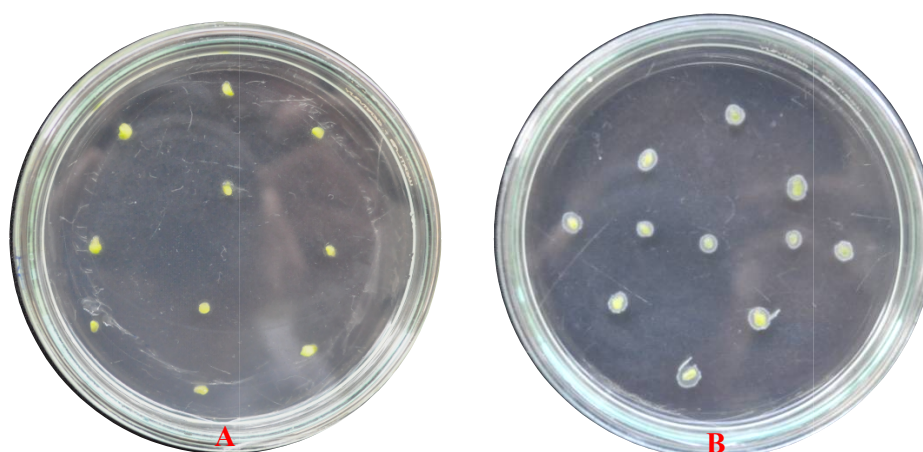
Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường nuôi chung (MS + 0,3 mg/l BA + 1 mg/l NAA + 100 μ M acetosyringone), PLBs trong cả hai trường hợp lây nhiễm và không lây nhiễm với vi khuẩn đều tăng trưởng bình thường và không có sự khác biệt. Nhưng ở trường hợp được lây nhiễm, vi khuẩn phát triển tạo thành các vòng khuẩn màu trắng bao quanh PLBs. Trái lại, ở các mẫu không được lây nhiễm, hoàn toàn không có sự xuất hiện vòng khuẩn (Hình 2).

Giai đoạn lây nhiễm đóng vai trò hết sức quan trọng đối với sự thành công của các thí nghiệm chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens*. Các yếu tố liên quan đến hoạt động của vi khuẩn và tăng trưởng của mẫu cấy cần được kiểm soát hợp lý để đảm bảo cho quá trình lây nhiễm diễn ra thuận lợi. Trong hầu

hết các trường hợp, luôn luôn tồn tại sự đối lập giữa hoạt động của vi khuẩn và sự tăng trưởng của mẫu cấy. Vi khuẩn hoạt động kém ít gây ảnh hưởng đến tăng trưởng của mẫu cấy nhưng lại làm giảm khả năng chuyển gen. Trái lại, sự hoạt động mạnh của vi khuẩn mặc dù làm tăng khả năng chuyển gen, nhưng đồng thời cũng ức chế sự tăng trưởng của mẫu cấy. Vì vậy, điều quan trọng là phải thiết lập một quy trình lây nhiễm đạt được sự cân bằng theo hướng có lợi nhất đối với hiệu quả chuyển gen. Kết quả thu được trong thí nghiệm này đã thể hiện được điều nêu trên, đó là vừa đảm bảo được hoạt động của vi khuẩn, vừa duy trì được sự tăng trưởng của mẫu cấy (PLBs).

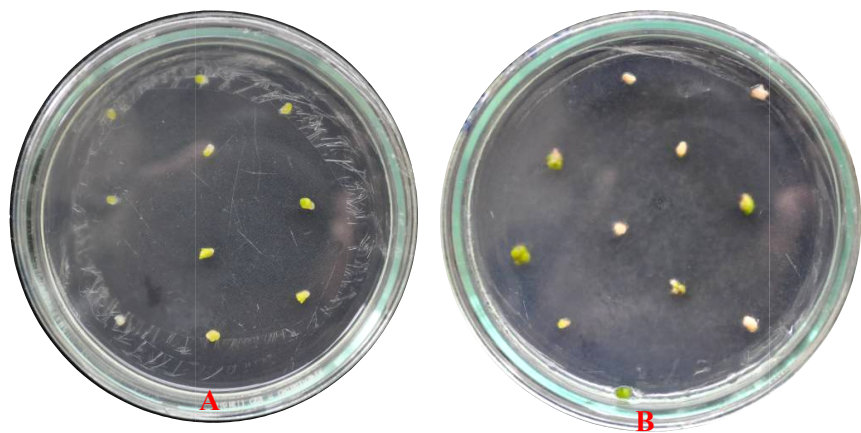
3.1.2. Giai đoạn khử khuẩn

Sau khi đã lây nhiễm với vi khuẩn, các PLBs được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường khử khuẩn (MS + 0,3 mg/l BA + 1 mg/l NAA + 300 mg/l cefortaxime) để loại bỏ vi khuẩn. Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường này, hầu hết các PLBs vẫn còn sống và không còn thấy sự phát triển của vòng khuẩn bao quanh. Một số PLBs còn có thể tiếp tục tăng trưởng trên môi trường khử khuẩn đến ngày thứ 14. Tuy nhiên, bên cạnh đó vẫn có một số PLBs bị chết (Hình 3).



Hình 2. PLBs của *Dendrobium Sonia* tăng trưởng trên môi trường nuôi chung sau 3 ngày

Ghi chú: A. Đối chứng (không ngâm với vi khuẩn); B. Lây nhiễm (ngâm với vi khuẩn)



Hình 3. PLBs của *Dendrobium Sonia* tăng trưởng trên môi trường khử khuẩn sau 7 ngày (A) và 14 (B) ngày nuôi cấy

Thông thường, đối với một thí nghiệm chuyển gen, để loại hoàn toàn vi khuẩn trong giai đoạn lây nhiễm cần có một nồng độ cefotaxime vừa diệt được hết vi khuẩn vừa đảm bảo được khả năng sống của mô. Trong thực tiễn, sự lựa chọn luôn được cân nhắc theo hướng ưu tiên cho việc loại vi khuẩn. Một nồng độ cefotaxime loại được hoàn toàn vi khuẩn với tỷ lệ mẫu sống không cao dễ dàng được chấp nhận hơn một nồng độ cho tỷ lệ mẫu sống cao nhưng có khả năng diệt khuẩn thấp. Nồng độ cefotaxime sử dụng trong thí nghiệm này đáp ứng được yêu cầu đặt ra; đó là có khả năng loại trừ hoàn toàn vi khuẩn sau giai đoạn lây nhiễm, đồng thời cũng duy trì được khả năng sống của PLBs ở một tỷ lệ chấp nhận được (khoảng từ 50 đến 80%).

3.2. Sàng lọc mẫu giả định chuyển gen

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin lên khả năng sống của PLBs

Sau 10 ngày nuôi cấy, tất cả PLBs vẫn sống sót trên môi trường bổ sung kanamycin ở tất cả các nồng độ. Tuy nhiên, sau 20 ngày nuôi cấy, bắt đầu có hiện tượng chết của PLBs xảy ra trên các môi trường có nồng độ kanamycin từ 400 - 700 mg/l, tỷ lệ chết cao nhất là 36,67% ở nồng độ kanamycin 700 mg/l. Ở thời điểm 40 ngày nuôi cấy, hiện tượng chết PLBs xảy ra mạnh mẽ hơn. Ngay cả ở các môi trường có nồng độ kanamycin thấp hơn 400 mg/l cũng có PLBs bị chết với một tỷ lệ nhất định, nhưng vẫn có giá trị cao nhất ở nồng độ kanamycin 700 mg/l (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin đến tỉ lệ chết của PLBs

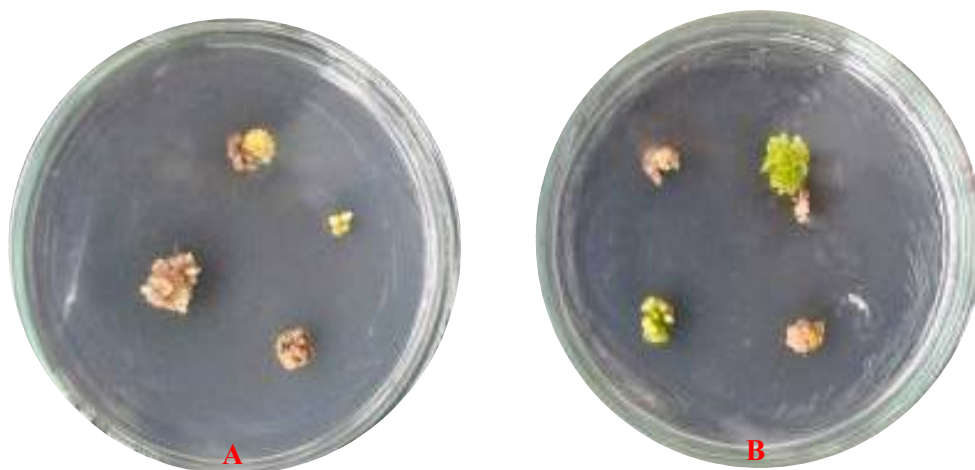
Nồng độ kanamycin (mg/l)	Tỷ lệ mẫu chết theo thời gian (% , ngày sau cấy)		
	10	20	40
0	0,00	0,00a	0,00a
100	0,00	0,00a	10,00a
200	0,00	0,00a	3,33a
300	0,00	0,00a	3,33a
400	0,00	10,00b	23,33b
500	0,00	13,33b	43,33b
700	0,00	36,67c	93,33c

Kanamycin thường được sử dụng để sàng lọc cây chuyển gen trong các thí nghiệm chuyển gen thực vật. Mô cấy chưa được chuyển gen (không có gen kháng kanamycin) sẽ chết sau một khoảng thời gian nuôi cấy nhất định trong các môi trường có bổ sung kháng sinh. Tùy thuộc vào nồng độ kháng sinh trong môi trường nuôi cấy mà các mô cấy sẽ phát triển, phát triển chậm hay chết hoàn toàn sau các khoảng thời gian khác nhau. Chỉ có các mô cấy được chuyển gen thành công (có mang gen kháng kanamycin) mới có thể tồn tại và phát triển trên môi trường có chất này. Tuy nhiên, nếu sử dụng nồng độ kháng sinh quá thấp hay quá cao đều sẽ cho những kết quả không tốt, ảnh hưởng đến hiệu quả chọn lọc mô chuyển gen hoặc gây lãng phí. Vì vậy, cần tìm ra nồng độ kanamycin thích hợp cho mục tiêu chọn lọc mô chuyển gen. Trong thí nghiệm này, hiệu quả gây chết PLBs của 6 nồng độ kanamycin sử dụng được phân chia tương đối rõ thành 3 mức: thấp (100-300 mg/l), trung bình (400-500 mg/l) và cao (700 mg/l). Các nồng độ kanamycin hiệu quả thấp không phù hợp với mục đích chọn lọc trong khi khoảng nồng độ cho hiệu quả trung bình có thể được sử dụng để sàng lọc sơ bộ trước khi chuyển sang sàng lọc chính thức với các nồng độ có hiệu quả cao.

3.2.2. Sàng lọc mẫu giả định chuyển gen

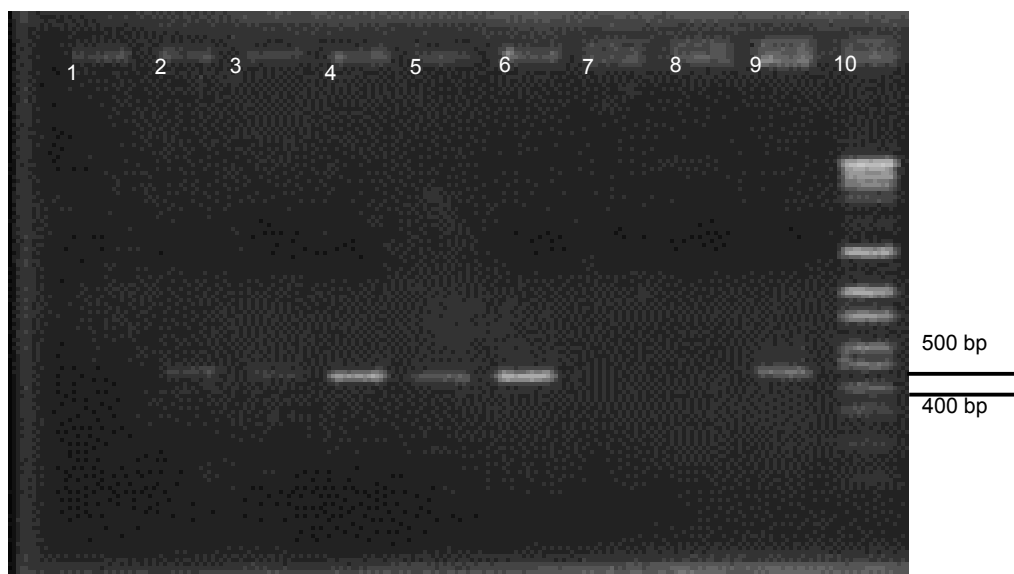
Sau khi được loại sạch khỏi vi khuẩn, các PLBs được chuyển sang môi trường sàng lọc mẫu giả định chuyển gen (MS + 0,3 mg/l BA + 1 mg/l NAA + 500 mg/l kanamycin). Quá trình sàng lọc với kanamycin được thực hiện trong hai giai đoạn. Giai đoạn đầu tiên hành sàng lọc với kanamycin ở nồng độ 500 mg/l (đây là nồng độ được đánh giá là có hiệu quả gây chết PLBs ở mức trung bình. Mặc dù ở nồng độ này, việc sàng lọc có thể chưa đạt yêu cầu (có thể bỏ sót một số PLBs không chuyển gen có sức sống cao) nhưng đảm bảo chắc chắn các PLBs mang gen mục tiêu có sức sống yếu không bị giết chết. Giai đoạn tiếp theo là sàng lọc với kháng sinh ở nồng độ 700 mg/l.

Kết quả, sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 500 mg/l kanamycin, hầu hết các PLBs đối chứng không chuyển gen đều chết. Trái lại, ở trường hợp có chuyển gen, bên cạnh một số PLBs chết vẫn còn một số PLBs sống (Hình 4). Các PLBs sống trong trường hợp này chỉ được xem là các mẫu giả định chuyển gen tạm thời. Để khẳng định chắc chắn, về nguyên tắc, cần phải sàng lọc tiếp giai đoạn hai dưới áp lực kháng sinh cao hơn trước khi tiến hành kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu. Tuy



Hình 4. PLBs của *Dendrobium Sonia* nuôi cấy trên môi trường sàng lọc có 500 mg/l kanamycin sau 60 ngày

Ghi chú: A. Đối chứng (không chuyển gen), B. Chuyển gen



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR để phát hiện gen mục tiêu trong mẫu giả định chuyển gen

Ghi chú: 1-6. Mẫu giả định chuyển gen; 7. Đối chứng không chuyển gen; 8. Đối chứng âm không có mẫu; 9: Đối chứng dương (khuẩn lạc vi khuẩn mang gen mục tiêu); 1. Thang DNA chuẩn

nhiên, để rút ngắn thời gian nghiên cứu, việc đó đã được thực hiện trực tiếp trên các PLBs thu được ở giai đoạn này.

3.3. Kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu

Sau khi sàng lọc, các PLBs được dùng để trích ly DNA và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi F-CCP1 và R-CCP1. Đây là cặp mồi đã được sử dụng để phân lập đoạn gen mục tiêu làm nguồn vật liệu cho việc thiết kế vector pK7GWIWG2(II)/CP. Nếu kết quả PCR bằng cặp mồi này cho kết quả dương tính và sản phẩm khuếch đại có kích thước đúng theo tính toán thì PLBs tương ứng chắc chắn có mang gen mục tiêu. Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm khuếch đại đúng sẽ có kích thước khoảng 450bp.

Kết quả, đã thu được 1 phân đoạn DNA ở vị trí giữa 400 và 500bp so với thang chuẩn. Như vậy, các PLBs tương ứng với vị trí có phân đoạn DNA này chắc chắn có mang gen mục tiêu (Hình 5).

Kết quả này cho thấy việc chuyển cấu trúc gen mục tiêu vào PLBs đã có thể thành công. Tuy nhiên, đây chỉ là kết quả bước đầu, còn cần phải thực hiện các thí nghiệm tiếp theo để

chứng minh cho sự hoạt động của cấu trúc gen này trong các dòng PLBs chuyển gen.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thu được PLBs của *Dendrobium Sonia* mang cấu trúc RNAi của gen CP từ virus CyMV bằng phương pháp chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens* C58.

4.2. Đề nghị

Nuôi cấy PLBs chuyển gen thành cây lan hoàn chỉnh, đồng thời tiến hành đánh giá khả năng kháng virus của cây lan chuyển gen để thu nhận giống lan kháng virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baulcombe D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363.
- Chu Hoàng Hà, Phạm Thị Vân, Lê Trần Bình (2009). Tạo cây trồng chuyển gen kháng bệnh virus bằng kỹ thuật RNAi. Báo cáo Hội nghị quốc gia về sinh vật biến đổi gen và quản lý an toàn sinh học, Hà Nội, tr. 19-28.

- Gottula J. and Fuchs M. (2009). Toward a Quarter Century of Pathogen-Derived Resistance and Practical Approaches to Plant Virus Disease Control. *Advances in Virus Research*, 75: 161-183.
- Lê Thị Ánh Hồng, Phan Tổ Phương, Trần Duy Quý, Nguyễn Mai Chi, Nguyễn Thúy An, Nguyễn Hằng Phương, Mai Thu Hà, Lương Thị Hải, Đàm Quốc Trụ, Nguyễn Văn Đồng (1999). Ứng dụng các kỹ thuật phân tử trong phát hiện và xác định bệnh hại thực vật ở Việt Nam. *Báo cáo Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội, tr. 301-313.
- Nguyễn Xuân Dũng, Nguyễn Quốc Toàn, Đặng Quỳnh Chi, Nguyễn Quốc Bình (2009). Phát hiện Cymbidium mosaic virus và Odontoglossum ringspot virus bằng Multiplex RT-PCR và Real-time RT-PCR. *Báo cáo Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc - khu vực phía Nam, thành phố Hồ Chí Minh*.
- Nguyễn Xuân Dũng, Dương Hoa Xô, Chu Hoàng Hà (2014). Tối ưu hóa sự chuyển nạp gen ở lan *Dendrobium Sonia* qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Sinh học*, 36(1se): 257-265.
- 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.
- Zettler F.W., Ko N.J., Wisler G.C., Elliott M.S, Wong S.M. (1990). Viruses of orchid and their control. *Plant Disease*, 74(9): 621-626.