

TẠO VECTOR BIỂU HIỆN CHỨA CẤU TRÚC microRNA NHÂN TẠO NHẪM BẤT HOẠT GENE TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita*

CONSTRUCTION OF AN ARTIFICIAL microRNA EXPRESSION VECTOR
FOR SILENCING A GENE OF *Meloidogyne incognita*

Nguyễn Vũ Phong

Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Các effector được phát hiện có vai trò quan trọng trong tính ký sinh của tuyến trùng gây hại thực vật. Các phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa effector đang được quan tâm nghiên cứu và hứa hẹn là công cụ hữu hiệu tạo giống cây trồng kháng tuyến trùng ký sinh thực vật. Trong nghiên cứu này, gene *Minc17980* mã hóa cho một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* ký sinh đậu nành. Trình tự của gene này có sự tương đồng 97% với mẫu hiện diện trên GenBank (ID: JK297517.1). Từ đó, hai cấu trúc microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene này được tổng hợp nhờ vào precursor *miR319a* của *Arabidopsis thaliana*. Các miRNA nhân tạo được gắn vào vector biểu hiện ở cây đậu nành nhằm tìm hiểu vai trò của effector *MINC17980* trong khả năng ký sinh thực vật của tuyến trùng sung rễ thông qua con đường làm câm lặng gene bởi cây chủ (HIGS).

Từ khóa: câm lặng gene, effector, *Meloidogyne*, microRNA, tuyến trùng ký sinh thực vật.

ABSTRACT

Effectors were found to play important roles in parasitism of plant-parasitic nematode. Gene silencing is one of the most studied strategies and is promising to be as an effective tool for producing plant varieties that are resistant to parasitic nematodes. In this study, the sequence of *Minc17980* gene, encoding for a pioneer effector with unknown function, was cloned from a *Meloidogyne incognita* isolate. The nucleotide sequence of this gene showed 97% identity to its homolog in GenBank (ID: JK297517.1) used as the control strain in our research. To generate a construct that can potentially knock-down the expression of *Minc17980* gene, two artificial microRNAs were synthesized based on the *miR319a* structure of *Arabidopsis thaliana* and inserted into an expression vector. These microRNAs can be expressed in soybean to investigate the function of *MINC17980* on parasitism of root-knot nematode via host-induced gene silencing approach (HIGS).

Keywords: effector, gene silencing, *Meloidogyne*, microRNA, plant-parasitic nematode.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tuyến trùng ký sinh thực vật (plant-parasitic nematode) là đối tượng gây hại cây trồng nghiêm trọng. Mỗi loài tuyến trùng có khả năng ký sinh trên nhiều loài cây khác nhau. Tuyến trùng gây hại trực tiếp lên hầu hết các bộ phận của cây và gián tiếp tạo điều kiện cho các tác nhân gây hại khác như vi khuẩn, virus xâm nhập gây hại nặng thêm. Các triệu chứng do tuyến trùng gây ra khó phân biệt với các tác nhân khác như thời tiết bất lợi hay thiếu dinh dưỡng. Thiệt hại do

tuyến trùng gây ra là một trong những yếu tố chính làm giảm sản lượng và chất lượng nông sản. Tuyến trùng sung rễ, *Meloidogyne* sp. là một trong những loài tuyến trùng ký sinh thực vật gây thiệt hại về kinh tế lớn nhất trên cây trồng ở vùng ôn đới và nhiệt đới (Trudgill và Block, 2001). Loài tuyến trùng này có khả năng ký sinh hơn 5.500 loài thực vật, ký chủ ưa thích là rau cải, cây họ đậu, cây lấy sợi, cây ăn quả và cây trồng đồn điền. *Meloidogyne* sp. có trên 60 loài, trong đó 4 loài *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla* là ký sinh gây

hại nghiêm trọng (Eisenback và Triantaphyllou, 1991). Tuyến trùng sung rễ có tính ký sinh chuyên tính cao, khả năng tiềm sinh lâu trong đất. Do đó mức độ ảnh hưởng của tuyến trùng rất lớn đến năng suất và chất lượng sản phẩm cũng như trong vấn đề tái sản xuất nông nghiệp.

Việc sử dụng các chất hóa học để kiểm soát tuyến trùng mang lại hiệu quả nhưng thiệt hại rất lớn đến hệ thực vật, động vật, môi trường và sức khỏe con người. Vì vậy việc sử dụng các chất hóa học đang ngày càng bị hạn chế và có xu hướng tiến đến ngừng sử dụng hoàn toàn. Ngày nay, phương pháp luân canh kết hợp với việc sử dụng các giống kháng bệnh được áp dụng nhưng hiệu quả còn rất hạn chế do tuyến trùng có phổ ký chủ rộng và có rất ít giống cây trồng kháng tuyến trùng. Do đó, việc tìm kiếm một phương pháp mới, thân thiện với môi trường để kiểm soát tuyến trùng là việc làm hết sức cần thiết. Các hiểu biết về sự tương tác giữa tuyến trùng sung rễ và ký chủ ở mức độ phân tử cần thiết để phát triển các chương trình kiểm soát tuyến trùng một cách bền vững. Hiện nay nhiều nghiên cứu tập trung vào việc xác định, mô tả đặc điểm, chức năng và ức chế sự biểu hiện các effector của tuyến trùng. Thật vậy, effector là các protein cụ thể được tiết ra bởi các tuyến trùng vào trong tế bào thực vật tạo thuận lợi cho tuyến trùng ký sinh cây chủ (Bellafiore và Briggs, 2010). Nhờ có hàng trăm effector, tuyến trùng có thể ký sinh trên hàng ngàn loài thực vật (Bellafiore và ctv, 2008). Nếu có thể làm ngừng hoạt động của các effector có nghĩa là giảm khả năng gây hại của tuyến trùng. Sử dụng phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa các protein độc tính này đang được quan tâm nghiên cứu và hứa hẹn là công cụ hữu hiệu tạo giống cây trồng kháng tuyến trùng sung rễ.

Trong nghiên cứu này, gene *Minc17980* mã hóa cho một effector chưa biết chức năng được tạo dòng từ mẫu tuyến trùng *M. incognita* tạo dữ liệu cho tổng hợp các microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene này. Các cấu trúc RNAi này được gắn vào vector biểu hiện ở cây đậu nành nhằm tìm hiểu vai trò của effector MINC17980 trong tiến trình ký sinh thực vật của tuyến trùng sung rễ thông qua con đường làm câm lặng gene bởi cây chủ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Tuyến trùng sung rễ *Meloidogyne incognita* race 1 được cung cấp bởi Stéphane Bellafiore, IRD Montpellier, Pháp, sử dụng làm nguồn tuyến trùng đối chứng.

Vector pRS300 chứa ath-miR319a precursor được cung cấp bởi Detlef Weigel, Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Đức (Schwab và ctv, 2006). Vector pSM103 chứa các gene *hptII* (kháng hygromycin), gene *aadA* (kháng kanamycin), cassette 35SP-erGFP7INT-NOS, đoạn miR319a của *Arabidopsis* chịu điều khiển bởi promoter GmUbiIII giúp biểu hiện đoạn microRNA ở cây đậu nành được cung cấp bởi Andrew F. Bent, University of Wisconsin-Madison, Mỹ (Melito và ctv, 2010).

Thu thập tuyến trùng sung rễ *Meloidogyne incognita*

Tuyến trùng *Meloidogyne* được thu thập từ các ruộng trồng đậu nành thuộc các tỉnh Tây Nguyên, Đông Nam Bộ và Tây Nam Bộ. Nguồn tuyến trùng được lưu giữ và nhân bằng cây cà chua trong điều kiện nhà lưới. Các dòng tuyến trùng được tách bằng cách lây nhiễm tất cả ấu trùng cảm nhiễm tuổi 2 (J2s) nở từ một bọ trứng lên cây cà chua 15 ngày tuổi. Sau 60 ngày, dòng tuyến trùng sung rễ *M. incognita* được nhận diện nhờ đặc điểm vân sinh môn con cái (theo phương pháp của Eisenback và Triantaphyllou, 1991) và SCAR-PCR với primer Mi-F (5'-TGAGGATTCAGCTCCCCAG-3') và Mi-R (5'-ACGAGGAACATACTTCTC-CGTCC-3') theo Zijlstra và ctv, (2000). Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose.

Tạo dòng gene *Minc17980* của tuyến trùng *M. incognita*

RNA tổng số của J2s được tách chiết bởi GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), tiếp đến tổng hợp cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) sử dụng primer oligo dT. Đoạn trình tự mã hóa protein được khuếch đại

bằng PCR với primer Mi-17980-F (5'-ATGT-TTTTTCTAAAATATTTCCCAATTTCA-3') và Mi-17980-R (5'-TTAATTCTTCTTTGAA-GACAAATTACAG-3'). Chu kỳ nhiệt của phản ứng gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và được nối đuôi polyA trước khi chèn vào vector pGEM-T Easy (Promega). Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt (Sambrook và Russell, 2001). Các khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng hệ thống xanh trắng và PCR colony. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) và gene tạo dòng được giải trình tự bởi công ty VNDAT.

Thiết kế và tổng hợp miRNA nhân tạo

Dựa vào trình tự gene *Minc17980* tạo dòng, các microRNA nhân tạo (amiRNA) có khả năng làm câm lặng biểu hiện gene mục tiêu được thiết kế nhờ công cụ Designer của phần mềm trực tuyến WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Các miRNA nhân tạo được lựa chọn theo các tiêu chí được đề xuất bởi Schwab và ctv (2006). Công cụ Oligo của WMD3 được sử dụng thiết kế các primer để thay thế đoạn 21 nu của precursor ath-mi319a bởi đoạn miRNA 21 nu mới nhờ kỹ thuật PCR overlapping theo Schwab và ctv (2006). Cấu trúc amiRNA mới được chèn trình tự nhận biết của hai enzyme *Bam*HI và *Pst*I (Thermo Scientific) ở hai đầu và nhân dòng bởi hệ thống vector pGEM-T Easy (Promega). Trình tự microRNA nhân tạo được kiểm tra bằng giải trình tự đảm bảo tính chính xác trước khi gắn vào vector biểu hiện pSM103.

Gắn cấu trúc amiRNA vào vector biểu hiện

Đoạn miR319a trong plasmid pSM103 được thay thế bằng đoạn trình tự amiRNA tổng hợp. Plasmid pSM103 và đoạn amiRNA được xử lý bằng enzyme cắt *Bam*HI và *Pst*I (Thermo Scientific) và nối với nhau nhờ T4 DNA ligase (Thermo Scientific) để tạo plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp pSM103-amiRNA được tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Trình tự và hướng chèn của amiRNA trong vector pSM103 được kiểm

tra trước khi biến nạp plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 để chuyển cấu trúc amiRNA vào cây chủ.

Kiểm tra trình tự các đoạn polynucleotide

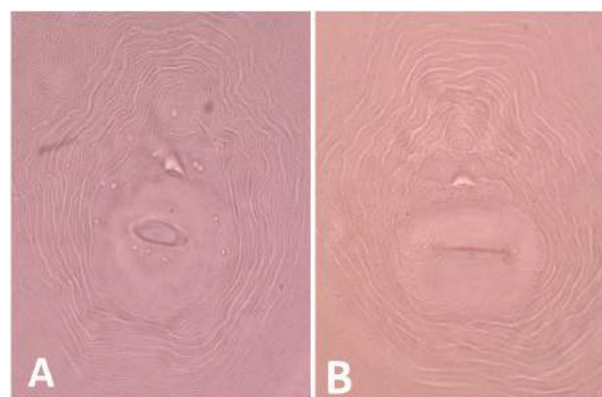
Trình tự các đoạn nucleotide tổng hợp được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit và so trình tự với trình tự thiết kế bằng công cụ BLAST (NCBI).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu thập tuyến trùng *Meloidogyne incognita*

Từ các mẫu đất, rễ sung thu thập đã phân lập được 12 dòng tuyến trùng sung rễ ký hiệu Mi-PN01 đến Mi-PN12. Trong nghiên cứu này dòng tuyến trùng Mi-PN03 được sử dụng do có khả năng gây hại cao hơn các dòng tuyến trùng khác (số liệu không công bố).

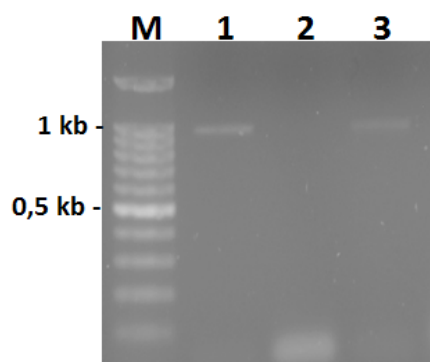
Để định danh tuyến trùng, hình dạng vân sinh môn của năm con cái trưởng thành từ mỗi dòng tuyến trùng được ghi nhận. Vân sinh môn của tất cả con cái trưởng thành đều có phần vân lưng nhô cao, đường vân không liên tục, vân bụng dạng lượn sóng; hậu môn con cái trưởng thành dạng gần tròn; âm hộ có hình khe ngang. Đối chiếu với mô tả của Eisenback và Triantaphyllou (1991) và dòng *M. incognita* race 1 (đối chứng) có thể kết luận các dòng tuyến trùng phân lập là tuyến trùng *M. incognita* (Hình 1).



Hình 1. Hình dạng vân sinh môn con cái tuyến trùng sung rễ (phóng đại 1.000 lần)
(A) *Meloidogyne incognita* race 1;
(B) Dòng tuyến trùng Mi-PN03

Để củng cố kết quả định danh bằng hình thái, SCAR-PCR với primer chuyên biệt phát hiện *M. incognita* đã được áp dụng theo phương

pháp của Zijlstra và ctv (2000). Kết quả điện di cho thấy đã khuếch đại một đoạn DNA kích thước tương đương 1000 bp từ DNA tổng số của J2s (Hình 2).

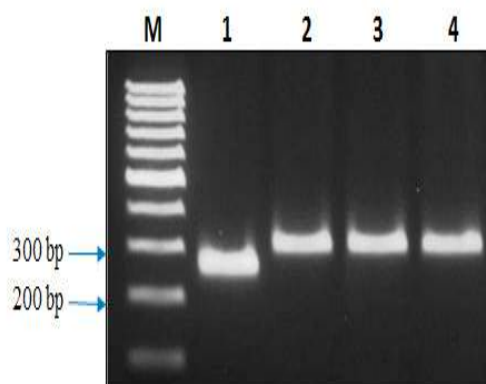


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR-SCAR mẫu tuyến trùng Mi-PN03

(M) DNA marker 100 bp; (1) *M. incognita* race 1 (đối chứng); (2) Đối chứng âm; (3) Mẫu Mi-PN03

Tạo dòng gene *Minc17980*

Từ cDNA tổng số của dòng tuyến trùng phân lập đã khuếch đại được sản phẩm có kích thước khoảng 300 bp tương ứng với kích thước gene mục tiêu (303 bp) (Hình 3).



Bảng 1. Trình tự hai microRNA nhân tạo lựa chọn

Tên	Trình tự	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	% GC	Vị trí bắt cặp với mRNA mục tiêu
amiR17980.1	UGAAGACAAAUACGGCCAC	-34,02	42	276-292
amiR17980.2	UAAUACGGUCACACUGGCCG	-37,03	52	268-283

Các đoạn amiRNA được tổng hợp bằng phương pháp PCR overlapping theo quy trình miêu tả bởi Schwab và ctv (2006) sử dụng các primer được cung cấp bởi công cụ Oligo từ

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại đoạn mã hóa gene

(M) DNA marker 100 bp; (1) Đối chứng dương 261 bp; (2) Sản phẩm PCR mẫu Mi-PN03

Kết quả tạo dòng gene trong vi khuẩn *E. coli* TOP10 sử dụng vector pGEM-T Easy cũng cho thấy đã tạo được vector tái tổ hợp mang đoạn gene mục tiêu. Trình tự đoạn gene khuếch đại từ dòng tuyến trùng Mi-PN03 thu thập được hiệu chỉnh và so sánh với trình tự gene *Minc17980* trong dữ liệu bộ gene của *Meloidogyne incognita* (Abad và ctv, 2008; https://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita) và NCBI (ID: JK297517.1) cho kết quả tương đồng 97%. Trình tự đoạn gene *Minc17980* của dòng Mi-PN03 được sử dụng làm khuôn để thiết kế các miRNA nhân tạo.

Thiết kế và tổng hợp miRNA nhân tạo

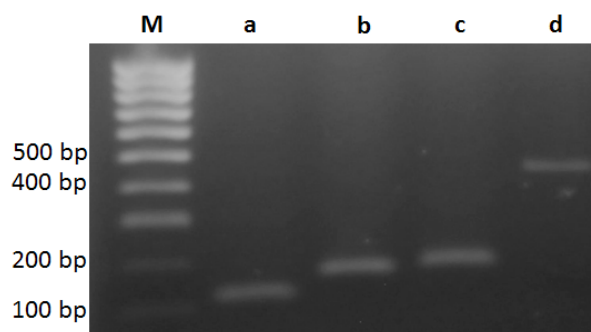
Trình tự đoạn gene *Minc17980* của dòng tuyến trùng Mi-PN03 được sử dụng để thiết kế các miRNA nhân tạo nhờ phần mềm WMD3. Từ danh sách các amiRNA gợi ý tiến hành chọn các ứng viên nhờ các tiêu chí như 1) bất hoạt gene mục tiêu ở tuyến trùng mà không bất hoạt các gene khác của đậu nành; 2) vị trí gắn của miRNA nhân tạo với mRNA mục tiêu nằm ở vùng 3'; 3) năng lượng liên kết giữa amiRNA với mRNA mục tiêu từ -35 đến -40 kcal/mol, không cao quá -30 kcal/mol; 4) không bắt cặp sai từ vị trí 2-12 của amiRNA đối với đoạn mục tiêu. Trong nghiên cứu này, hai microRNA nhân tạo được chọn ký hiệu là amiR17980.1 và amiR17980.2 (Bảng 1).

phần mềm WMD3 (Bảng 2). Do quy trình thực hiện tổng hợp hai microRNA là tương tự nhau nên kết quả tổng hợp amiR17980.1 được chọn trình bày trong phần này.

Bảng 2. Các primer sử dụng tổng hợp các microRNA nhân tạo bằng PCR overlapping

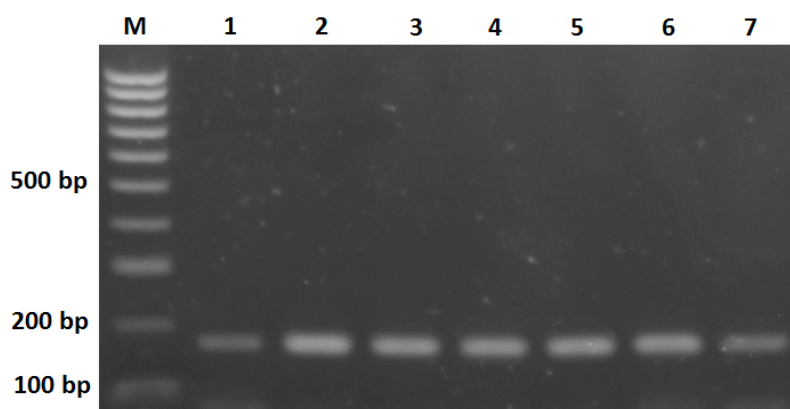
amiRNA	Primer	Trình tự (5' à 3')
amiR17980.1	I miR	gaTTGAAGACAAATTACGGCCACtctctcttttgattcc
	II miR	gaGTGGCCGTAATTTGTCTTCAAAtcaaagagaatcaatga
	III miR*s	gaGTAGCCGTAATTTCTCTTCATtcacaggtcgtgatatg
	IV miR*a	gaATGAAGAGAAATTACGGCTACtctacatatattcct
amiR17980.2	I miR	gaTAATTACGGTCACACTGGCCGtctctcttttgattcc
	II miR	gaCGGCCAGTGTGACCGTAATTAAtcaaagagaatcaatga
	III miR*s	gaCGACCAGTGTGACGGTAATTTtcacaggtcgtgatatg
	IV miR*a	gaAAATTACCGTCACACTGGTTCGtctacatatattcct
	At319a-F	cccCTGCAGccccaacacacgc
	At319a-R	cccGGATCC ccccatggcgatg

Sau khi tối ưu nhiệt độ bắt cặp và thời gian kéo dài của từng phản ứng thành phần (a, b, c) đã thu được được sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 119 bp, 176 bp, 182 bp. Các sản phẩm này dùng làm khuôn cho PCR overlapping (d) tổng hợp đoạn precursor mang đoạn amiRNA kích thước khoảng 428 bp đúng bằng kích thước lý thuyết mong đợi (Hình 4).

**Hình 4.** Kết quả điện di sản phẩm PCR tổng hợp amiR17980.1

(M): DNA marker 100 bp; (a, b, c, d): Các phản ứng PCR thành phần

Cấu trúc precursor mang amiR17980.1 được nhân dòng nhờ vector pGEM-T Easy trong tế bào *E. coli* TOP10 và sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp bằng PCR colony. Kết quả điện di cho băng DNA sáng, rõ và đúng kích thước dự kiến vào khoảng 176 bp (Hình 5).

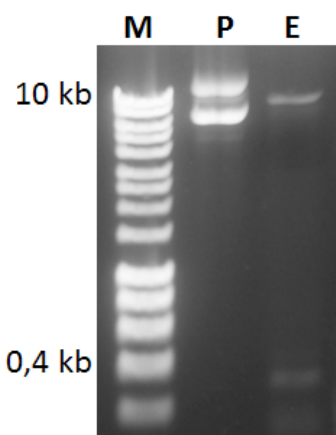
**Hình 5.** Kết quả điện di PCR colony sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp

(M): DNA marker 100 bp; (1- 7): Các colony vi khuẩn

Plasmid tái tổ hợp của 3 dòng vi khuẩn được tách chiết và gửi giải trình tự với primer M13. Kết quả sau hiệu đính cho thấy cấu trúc amiR17980.1 có chiều dài và trình tự đúng với dự tính.

Tạo vector biểu hiện cấu trúc amiRNA

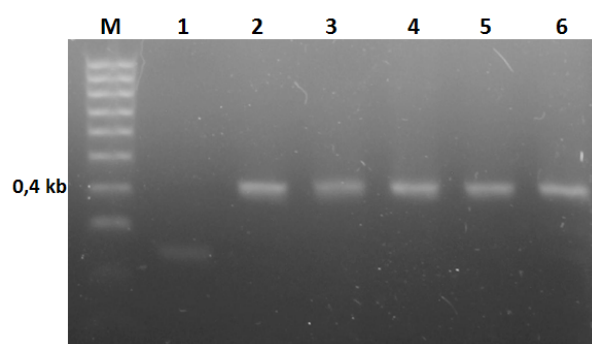
Vector pSM103 sử dụng trong nghiên cứu là vector biểu hiện cấu trúc amiRNA trong cây đậu nành. Cấu trúc amiRNA-Minc17980.1 và plasmid pSM103 được xử lý bằng enzyme cắt *Pst*I và *Bam*HI. Plasmid pSM103 khi được cắt bằng enzyme *Pst*I và *Bam*HI theo lý thuyết sẽ tạo sản phẩm có gồm hai phân đoạn có kích thước 412 bp và khoảng 12 kb. Trên thực tế, kết quả điện di sản phẩm cắt vector pSM103 cho một băng có kích thước lớn hơn 10 kb và một băng tương đương 400 bp (Hình 6).



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt bằng enzyme

(M): DNA marker 1 kb; (P): vector pSM103; (E): vector pSM103 cắt bằng *Bam*HI và *Pst*I.

Sản phẩm mục tiêu được thu hồi từ gel agarose bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) để ghép nối với nhau tạo plasmid tái tổ hợp amiRNA-Minc17980.1 sử dụng enzyme T4 ligase. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng vi khuẩn chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR colony (Hình 7).



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp (M): DNA marker 100 bp; (1) Đối chứng 261 bp; (2-6): các colony vi khuẩn.

Kết quả cho thấy đã tạo dòng thành công các amiRNA nhân tạo trong vi khuẩn *E. coli*. Các cấu trúc này được thu nhận và tiếp tục biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bằng phương pháp sốc nhiệt. Dòng vi khuẩn chứa vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin và áp dụng tạo cây đậu nành chuyển gene trong nghiên cứu tiếp theo.

Minc17980 là gene mã hóa một effector chưa biết chức năng của tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Effector này chứa một đoạn peptide tín hiệu (signal peptide) ở đầu N-terminal và có khả năng định vị bên trong nhân của tế bào chủ. Kết quả thực nghiệm cho thấy khi xử lý tuyến trùng với siRNA chuyên biệt cho mRNA bằng phương pháp soaking đã làm giảm hơn 50% độc tính của tuyến trùng (dữ liệu chưa công bố). Trong nghiên cứu này, trình tự gene *Minc17980* của dòng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* ký sinh đậu nành đã được xác định tương đồng 97% so với trình tự của *M. incognita* race 1 và một EST của *M. javanica*. Điều này làm phong phú thêm các nhận định về mức độ đa hình của các effector ở mức độ trong cùng một loài và liên loài (Abad và ctv, 2008; Bellafiore và Briggs, 2010). Để tìm hiểu chức năng liên quan đến độc tính của effector này ở tuyến trùng, hai cấu trúc miRNA nhân tạo đã được tổng hợp nhằm giảm mức độ biểu hiện của effector thông qua cây ký chủ (HIGS). Công việc tạo cây biến đổi gene và thử nghiệm sinh học cần tiếp tục

thực hiện để làm sáng tỏ vai trò của effector cung cấp thêm dữ liệu cho lựa chọn phương thức kiểm soát tuyến trùng sung rễ ở thực vật.

KẾT LUẬN

Trình tự gene *Minc17980* mã hóa effector chưa biết chức năng của dòng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* Mi-PN03 đã được xác định trình tự. Dựa vào trình tự của đoạn gene này đã thiết kế và tổng hợp thành công hai cấu trúc amiRNA có khả năng bất hoạt sự biểu hiện của gene *Minc17980*. Hai cấu trúc này đã được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để tạo cây đậu nành biến đổi gene nhằm làm sáng tỏ vai trò của effector MINC17980 của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* thông qua phương pháp câm lặng gene thông qua cây ký chủ (HIGS).

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Nguyễn Trang Tú Uyên, Chu Thị Huyền Trang, Trần Bảo Thắng, Lê Thị Phương Duy đã hỗ trợ công việc kỹ thuật. Nghiên cứu này thuộc đề tài mã số B2015-12-14 được tài trợ kinh phí bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abad Pierre, Jérôme Gouzy, Jean-Marc Aury, Philippe Castagnone-Sereno, Etienne G J Danchin, Emeline Deleury, Laetitia Perfus-Barbeoch, et al. 2008. Genome Sequence of the Metazoan Plant-Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26 (8):909–915.
- Bellafiore S and Briggs SP, 2010. Nematode effectors and plant responses to infection. *Current Opinion in Plant Biology* 13(4): 442-448.
- Bellafiore S, Shen Z, Rosso MN, Abad P, Shih P, Briggs SP, 2008. Direct reprogramming of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens* 4(10): e1000192.
- Eisenback DE and Triantaphyllou HH, 1991. *Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races*. In: Nickle WR, editor. *Manual of Agricultural Nematology*. New York: Marcel Dekker Inc: 191–274.
- Melito S, Heuberger AL, Cook D, Diers BW, MacGuidwin AE, Bent AF, 2010. A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the *Rhg1* locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance. *BMC Plant Biol.* 10:104.
- Sambrook J and Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Volume 1.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D, 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.
- Trudgill DL and Block VC, 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:53–77.
- Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M, 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847–853.